

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



**HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA:
CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO ETIOPATOGENICO**

CARLOS AUGUSTO PINTO

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

Doutor Miguel Enrique Alonso-Amelot

Doutor Armando Carvalho Louzã

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor João Vasco de Ávila de Sousa
Barcelos

Doutora Ana Cristina Silvestre Ferreira

ORIENTADOR

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

2010

LISBOA

À memória dos meus pais

Resumo

Pinto C. 2010. *Hematúria enzoótica bovina: contribuição para o seu estudo etiopatogénico*

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença de evolução crónica caracterizada por episódios intermitentes de hematúria, relacionados com o desenvolvimento de lesões inflamatórias e neoplásicas na superfície interna da bexiga, em bovinos com mais de 2 anos de idade. Os tumores de bexiga (Tbx) são a principal manifestação lesional da HEB.

No presente trabalho provou-se a associação entre a ingestão do feto comum (*Pteridium aquilinum*) e a HEB, identificaram-se as áreas da ilha de São Miguel mais afectadas pela HEB/Tbx, bem como, as práticas de manejo alimentar favorecedoras da ocorrência desta patologia nos bovinos. Foram doseados níveis elevados (média = $2\,533\,\mu\text{g.g}^{-1}$) de ptaquilósido (Pta) em 50 amostras de rebentos e frondes de feto comum colhidas nas pastagens micalenses. O Pta é um glucósido norsesquiterpenóide com propriedades mutagénicas, clastogénicas e cancerígenas. É considerado o principal composto tóxico do feto comum.

Na monitorização dos Tbx realizada no Matadouro Industrial de São Miguel (MISM), no período compreendido entre Jan/00 a Dez/09, constatou-se que o grupo de bovinos mais atingido pela HEB/Tbx foi o das vacas paridas com mais de dois anos de idade. Foram reprovadas para consumo 14,4% (16 986) das carcaças (117 755) desta faixa etária. Nos bovinos machos com mais de 2 anos a taxa de reprovações por Tbx foi de 0,65% (77/11 782), enquanto que nos bovinos até aos dois anos de idade foi de apenas 0,16% (69/42 723) Justifica-se a maior incidência de Tbx no grupo das vacas pela maior exposição desta população às toxinas do feto comum.

As condições climáticas e a orografia da ISM, associadas a práticas de manejo alimentar e de gestão das pastagens menos apropriadas favorecem e/ou promovem a ocorrência de patologia relacionada com a ingestão das toxinas do feto comum, designadamente surtos de IAF e HEB.

Registaram-se diferenças significativas nos parâmetros hematológicos estudados entre novilhas oriundas de explorações com e sem problemas de HEB/Tbx. O deficiente manejo alimentar e a maior exposição às toxinas do feto comum nas explorações com problemas de IAF e/ou HEB justificaram as diferenças observadas.

Foi realizado um rastreio de OE em 481 bovinos provenientes de 70 explorações de cinco ilhas do arquipélago, o qual revelou a existência de carências generalizadas de iodo, selénio, cobalto, cobre e zinco. O défice em OE foi mais acentuado nas novilhas de reposição, devido à ausência de suplementação com alimentos concentrados ou minerais na generalidade das explorações, tornando esta população mais vulnerável ao efeito tóxico do Pta. As novilhas criadas em explorações com problemas de HEB revelaram valores de GPx significativamente inferiores aos obtidos nas novilhas oriundas de explorações-controlo. Esta informação sugere que o selénio poderá desempenhar um importante papel na génese dos Tbx, à semelhança do que se verifica para algumas neoplasias humanas.

O mapeamento das lesões neoplásicas identificadas na mucosa de 100 bexigas de bovinos abatidos no MISM, possibilitou concluir que as áreas envolventes do trígono vesical e que se localizam ventralmente, com maior tempo de contacto com a urina, são aquelas que revelaram maior número de neoplasias. Esta informação é compatível com o metabolismo e acção biológica do Pta.

O rastreio de ADN viral de BPV-2 em 300 amostras de bexiga de bovinos com (n=200) e sem lesões neoplásicas (n=100), por técnicas de PCR, possibilitou constatar que cerca de 43% dos animais revelaram positividade. Contudo, não foram registadas diferenças de prevalência entre amostras com e sem lesões tumorais. São necessários estudos mais aprofundados para determinar qual o papel dos BPVs na génese dos Tbx.

As medidas profilácticas para a HEB implementadas na ISM visaram, predominantemente, o controlo e erradicação do feto comum das pastagens micaelenses. Estas têm-se revelado eficazes na redução do número de rejeições por Tbx no MISM, no número total de explorações afectadas pela HEB/Tbx e na redução de casos clínicos nos bovinos dos produtores com maior casuística de toxicidade provocada pelo feto comum. A taxa de rejeições por Tbx decresceu de 18% para 8,8% e o número de explorações atingidas pela HEB/Tbx decresceu de 60% para 33% no período compreendido entre 2004 e 2009.

Abstract

Pinto C.: 2010. *Bovine enzootic haematuria: a contribution on its etiopathology.*

Bovine enzootic haematuria (BEH) is a disease of chronic progress characterized by intermittent episodes of haematuria, associated with the development of inflammatory and neoplastic lesions of the inner surface of the urinary bladder in cattle of more than two years old. Urinary bladder tumours (UBT) constitute the main lesional feature of BEH.

The present study establishes the association between BEH and ingestion of bracken fern (*Pteridium aquilinum*). The areas on Sao Miguel Island (SMI) most affected by BEH/UBT were identified, together with the feed management practices promoting the occurrence of this pathology in cattle. High levels of ptaquiloside (average = 2,533 $\mu\text{g g}^{-1}$) were found in 50 bracken samples (mainly composed of croziers and soft parts of the weed) from pastures of SMI dairy herds. Ptaquiloside (Pta) is a norsesquiterpenoid glycoside with carcinogenic activity.

Slaughterhouse records obtained from the only abattoir on the island (SMI) during the period January 2000 to December 2009 showed that UBT was the main cause of whole carcass condemnations. 14.4% (16,986) of cows slaughtered (117,755) were rejected due to UBT. In male cattle of more than 2 years old the rate of condemnations due to UBT was 0.65% (77/11,782); this rate was only 0.16% (69/42,723) in males under 2 years old. The higher exposure of cows to bracken toxins can explain the differences observed.

The weather conditions and irregular topography of SMI, together with poor feed and pasture management practices favour and/or promote the occurrence of bracken-related diseases such as acute bracken poisoning (ABP) and BEH.

There were significant differences in haematological parameters between heifers from herds with and without HEB/UBT problems. Poor feed management and greater exposure to bracken toxins in problem herds could explain the differences found between these two groups.

A survey of trace elements in 481 cattle from 70 herds from five different islands of the Azores archipelago revealed that there are generalized deficiencies in iodine, selenium, cobalt, copper and zinc. Trace elements deficit was more pronounced in replacement heifers, due to the lack of supplementation with feed concentrates or

minerals in the majority of herds. This fact makes this population more vulnerable to the toxic effects of Pta. Heifers reared in herds with BEH problems showed low levels of glutathione peroxidase (GPx), compared with heifers from control herds. The information suggests that selenium could have an important role in UBT genesis, as has been found for some human cancers.

The results of mapping all neoplastic lesions seen in 100 urinary bladder mucosae from cattle slaughtered at the SMI abattoir showed that the areas surrounding the trigone and ventrally localized areas of the urinary bladder, which had more time in contact with urine, had greater numbers of neoplasias. This finding is compatible with the metabolic and biological activity of Pta.

Using PCR techniques, a survey of viral DNA of BPV-2 in a total of 300 cattle urinary bladder samples, 200 with neoplastic lesions and 100 controls, revealed that about 43% of animals were positive. However, there were no significant differences between cases and controls. Further, more detailed studies are needed to investigate the role of BPVs on UBT genesis.

Prophylactic measures for BEH were implemented to control and eradicate bracken from cattle pastures on SMI. These control measures were successful in reducing the number of condemnations due to UBT at the SMI slaughterhouse from 18% in year 2004 to 8.8% in year 2009. The total number of herds affected by UBT is also decreasing, from 60% in 2004 to 33% in 2009. At herd level, a reduction in the number of clinical cases of BEH and ABP has been observed, especially in the most affected herds.

Agradecimentos

À Professora Conceição Peleteiro por ter aceitado a orientação científica deste trabalho. As suas qualidades de liderança e de trabalho foram determinantes na concretização das múltiplas e ambiciosas tarefas propostas no âmbito desta tese. Expresso o meu reconhecimento e gratidão por ter acreditado neste projecto desde o seu início.

Ao Professor Armando Louzã, o meu “modelo de Professor”, pela amizade manifestada desde sempre, pelo seu humanismo, espírito de equipa, disponibilidade e generosidade para coordenar o primeiro projecto submetido a financiamento à Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Ao Professor Luís Silva pela coordenação do projecto: “Ecotoxicologia e controlo do feto comum (*Pteridium aquilinum*) na Ilha de São Miguel (Açores)” e pela excelente colaboração prestada na análise estatística dos dados incluídos nesta tese.

Ao Dr. Carlos Santos pela excelente coordenação do projecto: “Prevenção da hematúria enzoótica bovina por controlo do feto comum (*Pteridium aquilinum*) nas pastagens micaelenses”, pelo empenho manifestado, capacidade de liderança, apoio permanente e amizade transmitida desde sempre.

Ao Senhor Secretário Regional de Agricultura e Florestas, Dr. Noé Rodrigues, pelo financiamento concedido para a realização do trabalho de detecção das lesões precoces da hematúria enzoótica bovina, por detecção de danos no ADN provocados pelo ptaquilósido, na “School of Epidemiology and Health Sciences” da Universidade de Manchester, de Janeiro a Maio de 2005.

Ao Senhor Director Regional do Desenvolvimento Agrário, Eng. Joaquim Pires, por ter autorizado e financiado os projectos: “Prevenção da hematúria enzoótica bovina por controlo do feto comum (*Pteridium aquilinum*) nas pastagens micaelenses” e “Estudo de carências em oligoelementos na população bovina dos Açores”.

Ao Senhor Director do Serviço de Desenvolvimento Agrário de São Miguel (SDASM), Eng. Luis Viveiros, pelo apoio, incentivo e autorização, concedidos desde sempre, para a execução das múltiplas tarefas relacionadas com os projectos de investigação desenvolvidos no âmbito da hematúria enzoótica, fotossensibilidade, estudo de

carências minerais em bovinos e ensaios com oligoelementos no Posto Experimental de Culturas em Altitude (PECA).

A todos os Chefes de Divisão de Veterinária do SDASM, designadamente: Dolores Botelho, António Trindade, Filomena Medeiros, Luis Sequeira de Medeiros e Dagmar Sampaio, pelo apoio concedido na realização das tarefas inerentes aos projectos de investigação desenvolvidos.

A toda a equipa de epidemiologistas da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) de Lisboa pelo seu valioso contributo para este trabalho: Yolanda Vaz, Virgílio Almeida, Mário Melo e Isabel Neto.

À equipa de Inspectores Sanitários do Matadouro Industrial de São Miguel pelo seu profissionalismo, permanente colaboração no diagnóstico macroscópico dos tumores de bexiga e ajuda prestada na compilação dos dados relativos à monitorização desta patologia: Teresa Januário; Manuel Leitão e André Medeiros.

A todas os elementos da Secção de Anatomia Patológica da FMV pela hospitalidade e amizade com que sempre me receberam desde que iniciei o presente trabalho.

Aos colegas: Paula Pimentel, Gonçalo Forjaz e Paulo Aranha, que me acompanharam durante o seu estágio de licenciatura em Medicina Veterinária e que colaboraram activamente na colheita e processamento de amostras no âmbito desta tese.

Às Engenheiras Sandra Benevides e Aida Medeiros pela colaboração prestada na extracção do ADN e na realização do trabalho do papilomavírus.

À Doutora Ermelinda Cardoso do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil de Lisboa por me ter iniciado no complexo mundo da virologia.

À Ana Resendes, Ana Viveiros e Laura Tavares pela colaboração prestada na compilação e tratamento dos dados relativos à monitorização dos tumores de bexiga.

Ao Eng. Luís Vieira pela sua generosidade e disponibilidade para ajudar, sempre que necessário, na resolução de problemas informáticos.

Ao Senhor António Medeiros da Secção de Geografia da Universidade dos Açores pela excelente colaboração prestada e profissionalismo na elaboração dos mapas incluídos nesta tese.

Aos colegas Hélder Diniz, Nuno Mota, Deolinda Silva, Patrícia Medeiros e Ana Silva das Associações Agrícolas da ilha de São Miguel que referenciaram casos clínicos de intoxicação aguda pelo feto comum em bovinos.

Ao Miguel Saraiva Lima pelo companheirismo, amizade, partilha de conhecimentos e experiências profissionais muito enriquecedoras.

Ao Professores Jim Taylor, Saveria Campo, Dr. Barry Smith, Dr. Peter O'Connor, Dr. Roderick Robinson pelos valiosos ensinamentos e colaboração prestada durante o desenvolvimento da investigação realizada. Foi um privilégio ter convivido de perto com estes investigadores e ter apreciado a sua dimensão humana e científica.

A todos os produtores da Ilha de São Miguel que colaboraram na resposta ao inquérito epidemiológico e que disponibilizaram os seus animais para colheita de amostras.

À Mena, mãe dos meus filhos, com quem partilhei grande parte da minha vida afectiva e profissional.

Aos meus irmãos: Gi, Quim, Evinha e Tó, pelos laços que nos unem e que constituem referências muito especiais na minha vida

Ao João Martins e à Rosário Ribeiro, os meus “irmãos adoptivos”, pela amizade, permanente incentivo e apoio logístico proporcionado, durante os períodos de permanência em Lisboa para realização das tarefas desenvolvidas neste trabalho.

Ao Rui Lima e ao José Viana pela sua amizade e disponibilidade para me apoiar mesmo nos momentos mais difíceis.

À Joana Rita e ao João Pedro, os meus “tesouros”, que fazem de mim um pai orgulhoso.

À Isabel, o meu “porto seguro”, garantia da minha estabilidade afectiva, por ter aceitado o desafio de me acompanhar...

A todos aqueles que de forma anónima, mas igualmente importante, contribuíram para que a concretização dos estudos incluídos nesta tese fossem uma realidade.

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS OU ACEITES PARA PUBLICAÇÃO NO ÂMBITO DA DISSERTAÇÃO:

- Pinto C. A.; Lima R.; Louzã A. C.; Almeida V.; Melo M.; Vaz Y.; Neto Fonseca I.; Lauren D. R.; Smith B. L. (2000). Bracken fern induced bovine enzootic haematuria in São Miguel Island, Azores. *Bracken fern: toxicity, biology and control. Proceedings of the International Bracken Group Conference*. Manchester, 1999. Ed. J. A. Taylor and R. T. Smith.
- Pinto C. A.; Louzã A. C.; Almeida V.; Melo M.; Vaz Y.; Peleteiro, M. C.; Smith B. L. (2001) Caracterização epidemiológica da ocorrência de tumores da bexiga em populações de bovinos leiteiros da ilha de São Miguel. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Vol. XCVI (537): 11-19.
- Pinto C., Januário T., Geraldés M., Machado J., Carvalho T., Peleteiro M. C., Lauren D. R., Smith B. L., Robinson R. C. (2001). Hematúria Enzoótica Bovina na ilha de São Miguel – Açores. *Revista Portuguesa de Buiatria*. Dez. 2001:59-64.
- Pinto C., Medeiros, F.; Alves A.; Pires M.; Rodrigues, P.; Vala H.; Seixas, F.; Durão F.; Peleteiro, C.; Peña L.; Sanchez B. (2001) Neoplasias em bovinos de São Miguel – Açores. II - Estudo anatomohistopatológico. *Veterinária Técnica* 11 (1): 44-48.
- Pinto C., Januário T., Geraldés M., Machado J., Lauren D. R., Smith B. L., Robinson R. C. (2004). Bovine Enzootic Haematuria on São Miguel Island - Azores. *Poisonous Plants and Related Toxins*. Eds T. Acamovic, C. S. Stewart and T. W. Pennycott. CABI Publishing, Oxon, UK: 564-574.
- Carvalho T., Pinto C., Peleteiro M. C. (2006). Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. *Journal of Comparative Pathology* 134: 336-346.
- Pinto C., M. C. Peleteiro, M. A. Lobo, J. Machado, L. Silva (2007). Intoxicação aguda pelo feto comum [*Pteridium aquilinum* (L.) Kühn] em bovinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102 (563-564): 289-298.
- Carvalho T., Naydan D., Nunes T., Pinto C., Peleteiro M. C. (2009). Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic haematuria. *Vet. Pathol.* 46: 211-221.

PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO AO ABRIGO DOS QUAIS O TRABALHO FOI REALIZADO:

- Estudo Epidemiológico das Neoplasias dos Bovinos de São Miguel (Açores) causadas por Cancerígenos naturais do Feto Vulgar (*Pteridium spp*).

Projecto coordenado pelo Professor Armando Louzã da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e financiado pelo projecto PRAXIS/PSAU/C/SAU/117/96 da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (Jul/97 – Dez/99).

- Estudos Etiopatogénicos da Hematúria Enzoótica Bovina na Ilha de São Miguel (Açores).

Projecto coordenado pela Professora Conceição Peleteiro da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e financiado pelo projecto POCTI/1999/CVT/34320 da FCT (Jan/01 – Dez/04).

- Implementação de estratégias de controlo do *Pteridium aquilinum* nas pastagens micaelenses.

Projecto coordenado pelo signatário, desenvolvido e financiado pelo Serviço de Desenvolvimento Agrário de São Miguel em colaboração com o Eng. Aprígio Malveiro da Direcção de Serviços da Protecção das Culturas, Quinta de São Gonçalo, Ponta Delgada (Jul/01 a Set/02).

- Prevenção da hematúria enzoótica bovina por controlo do feto comum (*Pteridium aquilinum*) nas pastagens micaelenses.

Projecto coordenado pelo Dr. Carlos Santos responsável pela Direcção de Serviços de Agricultura e Pecuária da Secretaria de Agricultura e Florestas da Região Autónoma dos Açores; este trabalho tem sido desenvolvido nos períodos de Junho a Outubro desde 2004 até à presente data. Contou com a colaboração da Associação de Jovens Agricultores Micaelenses nos primeiros dois anos; tem sido promovido e financiado pela Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário e co-financiado pelos produtores que anualmente aderem a este programa.

- Ecotoxicologia e controlo do feto comum (*Pteridium aquilinum*) na Ilha de São Miguel (Açores).

Projecto coordenado pelo Professor Luís Silva do Centro de Investigação dos Recursos Naturais da Universidade dos Açores e financiado pelo projecto POCTI/AGG/48737/2002 da FCT (Out/03 – Jul/07).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E DE SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
Akt	Cinase serina/treonina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APT	Agente promotor dos tumores
BPV	Vírus da papilomatose bovina
BPV-2	Vírus da papilomatose bovina tipo 2
CAT	Catalase
CuZnSOD	Cobre, zinco superóxido dismutase
DPDI	Doenças provocadas por défice em iodo
FC	Receptores dos factores de crescimento
GMD	Ganho médio diário
GPx	Glutação peroxidase
GSH	Glutação
HEB	Hematúria enzoótica bovina
HF	Holstein-Frisiean
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERA	Espécies reactivas de azoto
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
HPV	Papilomavírus humano
IAMA	Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas
IIP	Iodo inorgânico plasmático
IL-1β	Interleucina
ISM	Ilha de São Miguel
Kb	Kilobase
Kd	kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MISM	Matadouro Industrial de São Miguel
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
mRNA	ARN mensageiro
NBVC	<i>Nutrition-Biochimie Vétérinaire Consultants</i>

NFAT	<i>Nucleated Factor of Activated T cells</i>
ND	Não determinado
NF-kB	Factor de transcrição nuclear
OE	Oligoelementos
ORF	<i>Open reading frames</i>
PCR	Reacção da polimerase em cadeia
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PECA	Posto Experimental de Culturas de Altitude
PKC	Proteino-cinases C
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
Prx	Peroxisoma
Pta	Ptaquilósido
PTPs	<i>Protein tyrosine phosphatases</i>
PVs	Papilomavírus
RAA	Região Autónoma dos Açores
RGA	Recenseamento Geral da Agricultura
RT-PCR	Reverse transcription–polymerase chain reaction
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SAU	Superfície agrícola útil
Sec	Selenocisteína
SIBOV	Sistema de identificação de bovinos
SNIRA	Sistema Nacional de Informação e Registo Animal
SOD	Superóxido dismutase
Src	Cinase do factor de crescimento
SRAF	Secretaria Regional de Agricultura e Florestas
SREA	Serviço Regional de Estatística dos Açores
TGF-β	<i>Tumour growth factor</i>
TNF-α	<i>Tumour necrosis factor</i>
TrxR	Tioredoxina reductase
Tbx	Tumores de bexiga
T₄	Tiroxina
UV	Ultra-violeta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organization

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVO.....	1
1.2 HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA (HEB).....	3
1.2.1 Importância económica da HEB nos Açores	6
1.3 CARACTERIZAÇÃO GEOGRÁFICA E ECONÓMICA DA ILHA DE SÃO MIGUEL	7
1.3.1. Geografia	7
1.3.2. Aspectos económicos e estrutura produtiva	8
1.3.3 Evolução histórica e ciclos produtivos.....	9
1.4 ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS SOBRE OS FACTORES ETIOPATOGÉNICOS DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA	13
1.4.1. Toxicidade provocada pelo feto comum.....	14
1.4.3. Stresse oxidativo, oligolementos e carcinogénese	28
1.4.3 Papel dos vírus da papilomatose na génese da hematúria enzoótica	40
1.5 ETAPAS DA CARCINOGENÉSE	40
1.6 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR, APOPTOSE E MORTE CELULAR	43
2. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO.....	49
2.1. INTRODUÇÃO.....	49
2.1.1. Caracterização do sistema produtivo.....	50
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.2.1. Constituição da base de dados.....	52
2.2.2. Caracterização do efectivo bovino e dos sistemas produtivos	52
2.2.3. Delineamento do estudo epidemiológico analítico tipo caso-controlo.....	52
2.2.4. Recolha de dados	53
2.2.5. Gestão e análise de dados.....	53
2.2.6. Agrupamento dos bovinos abatidos e rejeitados por tumores de bexiga nas diferentes faixas etárias	54
2.2.7. Estudo comparativo da incidência de tumores de bexiga nas vacas importadas abatidas	54
2.2.8. Identificação das freguesias e das explorações de bovinos leiteiros mais atingidas pela hematúria enzoótica	54
2.2.9. Determinação dos níveis de ptaquilósido.....	55
2.3 RESULTADOS.....	56
2.3.1 Caracterização do efectivo	56
2.3.2 Estudo caso-controlo.....	56
2.3.3. Rejeições por tumores de bexiga nas diferentes classes etárias de bovinos.....	61
2.3.4. Rejeições por tumores de bexiga na população de vacas importadas abatidas	62
2.3.5. Monitorização da incidência dos tumores de bexiga nas vacas abatidas no período compreendido entre Julho de 1989 e Dezembro de 2009	63
2.3.6. Determinação das áreas e explorações de maior incidência de hematúria enzoótica bovina	64
2.3.7. Relação da distribuição geográfica dos tumores de bexiga com a altitude e a orografia	65
2.3.8. Determinação dos valores de ptaquilósido nas explorações com problemas de intoxicação pelo feto comum	67
2.4. DISCUSSÃO.....	68
3. HEMATOLOGIA E OBSERVAÇÕES CLÍNICAS	75
3.1. INTRODUÇÃO	75
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
3.2.1. Caracterização clínica e epidemiológica dos surtos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF) em bovinos.....	80

3.2.2. Identificação de situações sub-clínicas de intoxicação pelo feto comum em novilhas de explorações muito afectadas pela HEB.....	81
3.2.3. Parâmetros hematológicos em vacas com sinais clínicos de HEB	81
3.3. RESULTADOS.....	82
3.3.1. Caracterização clínica dos surtos de intoxicação aguda pelo feto comum em bovinos.....	82
3.3.2. Identificação de situações sub-clínicas de intoxicação pelo feto comum em novilhas de explorações muito afectadas pela HEB	92
3.3.3. Parâmetros hematológicos em vacas com sinais clínicos de HEB.....	93
3.3.4. Identificação de práticas de manejo consideradas de risco para o aparecimento de toxidade pelo feto comum.....	95
3.4. DISCUSSÃO	98
4. ESTUDO DE CARÊNCIAS EM OLIGOELEMENTOS E SUA RELAÇÃO COM A HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.....	105
4.1. INTRODUÇÃO	105
4.1.1 Zinco.....	106
4.1.2 Cobre.....	106
4.1.3 Selénio	108
4.1.4 Iodo.....	109
4.1.4 Cobalto.....	112
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	114
4.2.1. Rastreio de oligoelementos na população bovina dos Açores.....	114
4.2.2. Rastreio de oligoelementos na população de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica	115
4.2.3. Ensaio com oligoelementos no crescimento de novilhos.....	115
4.3. RESULTADOS.....	118
4.3.1. Rastreio de oligoelementos na população bovina dos Açores.....	118
4.3.2. Rastreio de oligoelementos na população de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica	121
4.3.3. Resultados do ensaio com oligoelementos no crescimento de novilhos.....	122
4.4. DISCUSSÃO	125
5. MAPEAMENTO DAS NEOPLASIAS OBSERVADAS NA PAREDE INTERNA DA BEXIGA.....	131
5.1 INTRODUÇÃO	131
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	132
5.3 RESULTADOS.....	134
5.4 DISCUSSÃO	135
6. PAPILOMAVÍRUS E HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA	139
6.1 INTRODUÇÃO	139
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	147
6.3 RESULTADOS.....	148
6.4 DISCUSSÃO	149
7. PREVENÇÃO DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.....	153
7.1. INTRODUÇÃO	153
7.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	155
7.3. RESULTADOS.....	157
7.4. DISCUSSÃO	1160
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Vaca com hematúria na abegoaria do matadouro de Ponta Delgada (A); interior da bexiga com sangue, coágulos de sangue e neoplasia no canto superior direito (B); superfície interna da bexiga com múltiplos tumores (C)	2
Figura 1.2. Feto comum (<i>Pteridium aquilinum</i>)	6
Figura 1.3. Localização geográfica do arquipélago dos Açores: os continentes europeu e africano e a América do Norte	8
Figura 1.4. Principais factores etiopatogénicos da hematúria enzoótica bovina	14
Figura 1.5. Concentração de ptaquilósido ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas diferentes partes do feto comum e em diferentes fases de crescimento da planta.....	21
Figura 1.6. O ptaquilósido em condições alcalinas converte-se em dienona a qual induz a formação de aductos de ADN	23
Figura 1.7. Representação esquemática da formação intracelular de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e sua neutralização pelos antioxidantes	31
Figura 1.8. Mecanismos de lesão no ADN induzidos por elevadas concentrações de cobre, os quais podem conduzir à formação de cancro	37
Figura 1.9. Modelo em três estadios da carcinogénese: iniciação, promoção e progressão.....	42
Figura 1.10. Vias de sinalização celular induzidas pelas espécies reactivas de oxigénio (ERO) e pelos iões metálicos	44
Figura 2.1. Densidade de vacas leiteiras na Ilha de São Miguel	56
Figura 2.2. Distribuição geográfica na ilha de São Miguel das 70 explorações estudadas (50 explorações-caso e 20 explorações-controlo)	57
Figura 2.3. Pastagem de exploração controlo (A); pastagem de exploração com problemas de HEB	58
Figura 2.4 Distribuição geográfica pelas 59 freguesias da Ilha de São Miguel dos tumores de bexiga (Tbx) diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel desde o ano de 1995 a 2009.....	66
Figura 2.5. Mapa da Ilha de São Miguel com as diferentes altitudes e orografia.....	67
Figura 3.1. Grupo heterogéneo de novilhas em exploração com casos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF).....	83
Figura 3.10. Novilhas pertencentes a uma exploração com problemas de HEB. É evidente o mau manejo alimentar e a fraca condição corporal dos animais. Maio/2001	96
Figura 3.11. Práticas de risco associadas à intoxicação aguda ou crónica pelo <i>Pteridium aquilinum</i> na ilha de São Miguel	96
Figura 3.12. Vacas de exploração muito atingida por casos clínicos de hematúria enzoótica e com elevado nº de registos de reprovações por tumores de bexiga no MISM	97

Figura 3.2. Hemorragias cutâneas, no pescoço, orelhas e focinho em novilha com intoxicação aguda pelo feto comum.....	84
Figura 3.3.. Hemorragias cutâneas: (A) nas orelhas, (B) focinho e (C) membro posterior; (D) equimose na esclera. Novilha com intoxicação aguda pelo feto comum	84
Figura 3.5. Sintomas de intoxicação aguda pelo feto comum	85
Figura 3.6. Sintomas de intoxicação aguda pelo feto comum em novilha de exploração com graves problemas de hematúria enzoótica	85
Figura 3.7. O exame por citologia aspirativa da medula óssea esternal das novilhas com sintomas de intoxicação aguda pelo feto comum	89
Figura 3.8. (A) Hemorragias em toalha na serosa ruminal); (B) necrose com ruptura intestinal; (C) petéquias e sufusões hemorrágicas na mucosa da bexiga, iniciação da carcinogénese?; (D) fragmentos de <i>Pteridium aquilinum</i> no conteúdo ruminal.....	90
Figura 3.9. (A) Petéquias e úlceras na mucosa abomasal; (B) enterite e úlcera no cólon; (C) espessamento da parede do íleo com extensas lesões hemorrágicas e coágulo no lume intestinal; (D) cistite com petéquias e úlceras na mucosa da bexiga	90
Figura 4.1. Oligoelementos essenciais para bovinos em pastoreio	105
Figura 4.2. Selenoproteoma humano, constituído por 25 selenoproteínas agrupadas de acordo com a sua função, determinada ou potencial, exercida no organismo.....	109
Figura 4.3. Vaca com bócio: hipertrofia da região cervical ventral superior	111
Figura 4.4. (A) Vaca com acromotriquia pertencente a exploração com inúmeros casos de hematúria enzoótica, Capelas, Out/2004; (B) novilha com acromotriquia e depressão do estado geral por intoxicação aguda pelo feto comum, proveniente de exploração com graves problemas de toxicidade pelo <i>Pteridium aquilinum</i> , Ginetes	114
Figura 4.5. Vista aérea do Posto Experimental de Culturas de Altitude (PECA); composto por 25 Ha de pastagem, distribuídos por 24 parcelas	116
Figura 4.6. Aspecto geral das parcelas e dos novilhos incluídos no ensaio de suplementação com oligoelementos no Posto Experimental de Culturas em Altitude	117
Figura 4.7. São notórias as diferenças no desenvolvimento das massas musculares e no aspecto da pelagem entre bovinos com e sem suplementação com oligoelementos na forma de cápsulas intra-ruminais de libertação lenta.....	123
Figura 4.8. Comportamento alimentar dos novilhos: o animal da direita, não suplementado com oligoelementos	124
Figura 5.1.. (A) Esquema anatómico da bexiga humana masculina, com visualização das estruturas internas após corte sagital	132
Figura 5.2. Superfície interna de duas bexigas com tumores	133
Figura 5.3. Exemplo de ficha de registo dos dados relativos ao mapeamento das lesões suspeitas de neoplasia, no interior da parede interna da bexiga	134
Figura 5.4. Distribuição das lesões neoplásicas macroscópicas observadas na parede interna da bexiga de 100 bovinos abatidos no Matadouro Industrial de São Miguel no período compreendido entre Setembro de 2002 e Janeiro de 2003.....	135

Figura 6.1. Novilhas com lesões exuberantes e persistentes de papilomatose	140
Figura 6.2. Aspecto da cápside proteica de um papilomavírus (canto superior direito). Representação esquemática da organização genómica do BPV-1	141
Figura 6.3. Papilomas múltiplos, exuberantes e persistentes localizados no lábio inferior, focinho e na extremidade do membro anterior direito de uma vaca com 9 anos de idade pertencente a uma exploração onde se registaram casos de hematória enzoótica	143
Figura 6.4. Representação esquemática dos eventos que conduzem à génese dos tumores de bexiga (Tbx) induzidos pelos BPV-2 em sinergia com as toxinas do feto comum, em bovinos que pastoreiam em áreas infestadas pelo <i>Pteridium spp.</i>	144
Figura 6.5. (A) Carcinoma da faringe e do esófago de bovino, com hipertrofia dos linfonodos retrofaríngeos. Salienta-se a presença simultânea de lesões neoplásicas na mucosa da bexiga; estas amostras foram colhidas de uma vaca leiteira proveniente de uma exploração que apresentava graves problemas de hematória enzoótica (Ginetes, Jul/1999). (B) Tumor exofítico exuberante localizado no rúmen; (C) Tumor exofítico do esófago; (D) Papiloma exuberante preenchendo o lume esofágico de bovino	146
Figura 6.6. Resultados obtidos na electroforese de 11 amostras amplificadas por PCR para detecção de BPV-2	149
Figura 6.7. Resultados obtidos na electroforese de amostras de ADN da bexiga amplificadas por PCR após a utilização de um <i>primer</i> derivado do ADN da actina bovina	149
Figura 7.1. Principais aspectos morfológicos do <i>Pteridium spp</i>	154
Figura 7.2. Tecnologias de controlo e erradicação do feto comum com aplicação de herbicidas nas condições de relevo e tipo de infestação pelo <i>P. aquilinum</i> existente nas pastagens micaelenses	156
Figura 7.3. Distribuição geográfica por freguesia de 2101 tumores de bexiga diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel no ano de 2004	158
Figura 7.4. Distribuição geográfica por freguesia de 849 tumores de bexiga diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel no ano de 2009	158
Figura 7.5. Novilhas em pastoreio no Pico de Salomão no Verão (Jul/04)	160

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1. Crescimento exponencial das rejeições por tumores de bexiga (Tbx) em função da idade das vacas abatidas.....	63
Gráfico 2.2. Monitorização da incidência de tumores de bexiga nas vacas abatidas no Matadouro Industrial de São Miguel (MISM) no período compreendido entre 1 de Julho de 1989 e 31 de Dezembro de 2009.....	63
Gráfico 2.3. Evolução do número de explorações de bovinos leiteiros afectadas por tumores de bexiga desde 1995 até 2008.....	65
Gráfico 3.1. Distribuição anual das ocorrências clínicas registadas de intoxicação aguda pelo feto comum (<i>Pteridium aquilinum</i>) em bovinos dos Açores, relativas aos anos compreendidos entre 1995 e 2005	82
Gráfico 4.1. Evolução dos pesos médios do grupo de 11 novilhos controlo e do grupo de 11 suplementados com oligoelementos na forma de cápsulas intra-ruminais de libertação lenta	123
Gráfico 7.1. Evolução do número de tumores de bexiga diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel, no período compreendido entre 1998 a 2009, numa exploração com cerca de 230 vacas leiteiras onde se registaram graves problemas de hematúria enzoótica e de intoxicação aguda pelo feto comum.....	159

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Montantes gastos em seguros de reses e em compensações financeiras aos proprietários de bovinos portadores de tumores desde 2000 até 2006	7
Tabela 1.2 Principais ciclos produtivos da Ilha de São Miguel e do arquipélago dos Açores	10
Tabela 1.4. Probabilidade ou risco (<i>Odds Ratio</i>) das populações humanas sofrerem de carcinomas do tracto digestivo superior.....	27
Tabela 1.5 - Espécies reactivas de oxigénio e de azoto mais comuns nas células aeróbias	29
Tabela 1.6 - Fontes internas e externas de radicais livres	30
Tabela 1.7 - Causas de stresse oxidativo	30
Tabela 1.8 - Factores que aumentam as defesas antioxidantes	34
Tabela 1.9 Oligoelementos essenciais: propriedades químicas e distribuição na natureza	39
Tabela 2.1. Variáveis com diferenças significativas em relação à presença do feto comum nas parcelas.....	59
Tabela 2.2. Variáveis com diferenças significativas em relação ao consumo de feto comum observado.....	60
Tabela 2.3. Variáveis com diferenças significativas entre explorações-caso e explorações-controlo.....	60
Tabela 2.4. Total de bovinos abatidos e rejeitados por tumores de bexiga (Tbx), agrupados por classes etárias (categorias) no Matadouro Industrial de São Miguel no período compreendido entre Janeiro de 2000 a Dezembro de 2009	62
Tabela 2.5. Incidência de tumores de bexiga nas vacas importadas abatidas e idade média respectiva	62
Tabela 2.6. Dados anuais do número de vacas leiteiras e de explorações na ilha de São Miguel, distribuição total e percentual de explorações com pelo menos um caso diagnosticado de tumor de bexiga no Matadouro Industrial de São Miguel	64
Tabela 2.7. Valores de ptaquilósido em 50 amostras de rebentos e frondes de feto comum (<i>Pteridium aquilinum</i>), colhidas em pastagens de explorações com problemas de hematúria enzoótica bovina e/ou com casos diagnosticados de intoxicação aguda pela planta.....	67
Tabela 3.1 Valores hematológicos em bovinos com sinais de intoxicação aguda pelo feto comum e em bovinos saudáveis (controles).....	87
Tabela 3.1. Paralelismo entre as alterações induzidas por radiações ionizantes e as provocadas pela ingestão das toxinas do feto comum	75
Tabela 3.2. Parâmetros hematológicos avaliados, unidades e intervalo de referência	77
Tabela 3.2. Valores leucocitários de bovinos com sinais de intoxicação aguda pelo feto comum e bovinos saudáveis (controles).....	88
Tabela 3.3. Classificação morfológica das populações eritrocitárias e das anemias.....	79

Tabela 3.4. Valores de ptaquilósido, potássio e fósforo em amostras de feto comum (<i>Pteridium aquilinum</i>), azevém (<i>Lolium perenne</i>) e trevo branco (<i>Trifolium repens</i>), colhidas em pastagens micaelenses.....	91
Tabela 3.5. Eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas em duas populações de novilhas, clinicamente saudáveis, pertencentes a explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica	92
Tabela 3.6. Leucócitos em duas populações de novilhas pertencentes a explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica	93
Tabela 3.7. Parâmetros eritrocitários e plaquetários obtidos em duas populações de vacas de raça Holstein-Friesian: 61 com sinais clínicos de hematúria enzoótica bovina e 164 clinicamente saudáveis	94
Tabela 3.8. Classificação morfológica das anemias observadas numa população de 61 vacas com sintomas clínicos de hematúria enzoótica bovina, com base no volume corpuscular médio (VCM) e na concentração média de hemoglobina corpuscular (CMHC)	94
Tabela 3.9. Valores leucocitários de bovinos com sinais de hematúria enzoótica e bovinos saudáveis (controles)	95
Tabela 4.1. Anomalias consecutivas à deficiente ingestão de iodo	110
Tabela 4.10. Valores de oligoelementos nos dois grupos de novilhos no final do ensaio	125
Tabela 4.2. Substâncias bociogénicas, princípios activos, função e sua origem provável	112
Tabela 4.3 Composição nutricional das cápsulas intra-ruminais de libertação lenta de oligoelementos	117
Tabela 4.4 Número e percentagem de bovinos e explorações com valores de oligoelementos (OE) e tiroxina inferiores aos valores de referência.....	119
Tabela 4.5. Valores de oligoelementos (OE) e tiroxina (T ₄) na população de bovinos dos Açores	120
Tabela 4.6 Valores de zinco, cobre, selénio (GPx = glutathione peroxidase), iodo plasmático (IIP) e cobalto (Vitamina B ₁₂) em bovinos de explorações com e sem problemas de intoxicação aguda pelo feto comum e/ou hematúria enzoótica (controles)	121
Tabela 4.7. Efeito da suplementação com oligoelementos e do n° de pesagens no peso vivo de novilhos em pastoreio	122
Tabela 4.8 Cálculo do ganho médio diário (GMD) e do ganho líquido em euros (€) por cada bovino suplementado, durante o período de 155 dias	122
Tabela 4.9 Comparação entre os principais parâmetros hematológicos avaliados no final do ensaio nos dois sub-grupos de animais: controlo (não suplementado) e suplementado com duas cápsulas intra-ruminais de All-Trace®	125
Tabela 6.1. Propriedades biológicas e organização genómica por cada género da família Papillomaviridae, com relevância para as espécies domésticas	142
Tabela 6.2. Tumores malignos dos bovinos associados a infecções por papilomavírus	146
Tabela 6.3 Resultados da pesquisa de papilomavírus tipo 1 e tipo 2 em amostras de ADN da bexiga de bovinos com e sem lesões tumorais	148

Tabela 6.4. Compilação dos dados obtidos por diferentes equipas de investigação no rastreio de BPV 1 e 2 em amostras de bexiga de bovino com e sem lesões neoplásicas	150
---	-----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativo

A razão da realização deste trabalho prende-se com o fascínio exercido pela paisagem micalense num jovem de 24 anos, recém-licenciado em Medicina Veterinária e que visita pela primeira vez a Ilha de São Miguel, em Agosto de 1985. As parcelas de pastagem verdejante, divididas por hortênsias em plena floração, as vacas a pastorear e o contraste com o azul do mar formavam um cenário idílico de “*cortar a respiração*”. Estes factores aliados a outras razões de natureza familiar fizeram despoletar o interesse em desenvolver ou iniciar a actividade profissional na área da clínica e patologia de bovinos neste “*paraíso*” terreno. A concretização deste “*sonho*” veio a acontecer cerca de 9 anos mais tarde, em 1994, depois de uma experiência muito enriquecedora em termos de crescimento científico e humano na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Esta passagem por Vila Real, integrando a primeira leva de docentes da segunda e recém-criada Licenciatura em Medicina Veterinária do País, possibilitou o crescimento e a desenvoltura necessária em termos científicos e intelectuais para levar a bom termo o desenvolvimento e a concretização de um trabalho desta natureza.

O elevado número de casos de hematúria enzoótica bovina (HEB) observados na prática clínica e a elevada taxa de rejeições totais de carcaças de bovino, devido à presença de tumores de bexiga (Tbx) no Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel (MISM), desencadeou o interesse e a motivação necessária para o estudo e caracterização deste problema.

A importância deste tema saiu reforçada com a compilação e análise dos dados da Inspeção Sanitária, relativos às causas de rejeição total de carcaças no MISM através de uma análise retrospectiva desde Jul/89 até Jun/95 (Pinto et al., 1996a). Neste trabalho constatou-se que a taxa de rejeição devida a neoplasias nos bovinos abatidos assumia proporções significativamente mais elevadas que em outras regiões do País.

Os Tbx constituem a principal manifestação lesional da HEB (Fig. 1) e representam mais de 90% das neoplasias observadas no único matadouro aprovado para laboração na Ilha de São Miguel (ISM).



Figura 1.1. Vaca com hematúria na abegoaria do matadouro de Ponta Delgada (A); interior da bexiga com sangue, coágulos de sangue e neoplasia no canto superior direito (B); superfície interna da bexiga com múltiplos tumores (C)

Apesar das acções de formação e sensibilização dos produtores de leite realizadas em várias freguesias da ISM e em diferentes cursos para Jovens Empresários Agrícolas e da implementação de medidas profiláticas para controlo da HEB em algumas explorações, o problema dos Tbx continua a ser a principal causa de rejeição de carcaças de bovinos naquela unidade industrial.

O tratamento jornalístico pouco adequado desta temática, em Setembro e Outubro de 1997, conduziu à mediatização deste problema, com consequências que poderiam ter sido gravosas para a fileira do leite e para a pecuária açoriana no seu todo.

Devido ao facto do sector agro-pecuário continuar a ser um importante pilar da economia regional, muito dependente ainda da "*monocultura*" da vaca, este trabalho assumiu particular relevância na última década.

Mais de 90% da superfície agrícola útil (SAU) dos Açores continua a ser usada como pastagem para a criação e exploração de bovinos, predominantemente da raça *Holstein-Friesian* na maior parte das ilhas do arquipélago (Sampaio, 2006), contribuindo esta para 27% da produção de leite do País (PRORURAL, 2007).

A garantia da sustentabilidade e rentabilidade futura da pecuária açoriana inclui o controlo e prevenção de doenças como a HEB e de outros problemas a ela associados, como as carências em minerais, com particular relevância para os oligoelementos, aos quais foi dada especial atenção no desenvolvimento do presente trabalho.

1.2 Hematúria enzoótica bovina (HEB)

A HEB é uma doença crónica caracterizada clinicamente pela presença de hematúria intermitente, anemia, muitas vezes associada a fraca condição corporal. Na maior parte dos casos a doença é diagnosticada pela primeira vez quando os bovinos têm entre 4 a 6 anos de idade, tendo um período de incubação mínimo de 2 anos (Dawra e Sharma, 2001).

Nos primórdios do estudo desta afecção, a HEB foi conhecida ou designada por diferentes nomes, tais como: “hematúria essencial”, “cistite hemorrágica”, “hematúria dos bovinos”, “cistite verrucosa”, “*red water*”, “*bovine haematuria*”, “*enzootic haematuria*”, “urocistite”, “*haemorrhagica*” e “cistite crónica hemorrágica” (Datta, 1952) Tanto quanto é do nosso conhecimento, os primeiros casos de HEB relatados no nosso país foram designados por “cistite hemorrágica” e referem-se a ocorrências registadas na Ilha da Madeira pelo Dr. Bacili Dionísio, no exercício das funções como inspector sanitário do Matadouro do Funchal (Dionísio, 1963).

Em descrições relativas à colonização da Ilha de São Miguel (Açores), feitas pelo historiador micalense Gaspar Frutuoso, no século XVI, há referências a quadros sintomáticos de hematúria observados em bovinos, associados nessa época, à presença e ingestão de “rama da ginja” (Frutuoso, 1998), que se supõe ser a ginja do mato: *Prunus lusitanica*, subespécie *azorica* (Silva, 2008). Os primeiros casos de HEB registaram-se em vários países europeus, sendo Tophan em 1787, o primeiro investigador a caracterizar a doença (Dawra e Sharma, 2001), seguindo-se outros na década de 1840 no Reino Unido (Datta, 1952).

A HEB ocorre predominantemente em áreas montanhosas do Globo que tenham sido desflorestadas e convertidas em pastagens (Dawra e Sharma, 2001). As regiões

afectadas pela HEB incluem normalmente solos ácidos onde cresce um tipo de vegetação bem adaptada, como o *Oxalis spp.* (Cornicularia), vulgarmente conhecida como erva azedinha e plantas do género *Pteridium*. Estudos realizados na Roménia (Lacatusu et al., 1993), concluíram que os solos das regiões atingidas pela HEB são normalmente carenciados em fósforo e molibdénio. Verificou-se contudo, que os mesmos solos apresentam concentrações excessivas de ferro, manganês e cobalto e que são mais ricos em metais pesados, como o chumbo, o crómio, o níquel, o cádmio e o alumínio, quando comparadas com as zonas livres de HEB. Os solos das áreas onde ocorre a HEB são também mais abundantes em húmus vegetal (matéria orgânica).

Nos países onde se pratica uma agricultura intensiva e desenvolvida, como na Dinamarca e na Holanda, não existem casos registados de HEB, embora esta esteja referida nos países vizinhos (Rosenberger, 1971, citado em Dawra e Sharma, 2001).

Os sintomas clínicos da doença podem subdividir-se em três fases distintas (Datta, 1952): (i) Pré-clínica, (ii) Clínica e (iii) Terminal. Na primeira fase (i) não se verificam quaisquer alterações sistémicas no animal, sendo apenas possível detectar alguns eritrócitos no exame de sedimento urinário. Na fase clínica (ii) a urina torna-se corada de vermelho vivo e contém um número considerável de eritrócitos intactos, contrariamente a outras síndromes que provocam hemoglobinúria. Nestes casos a urina não contém eritrócitos intactos e apresenta uma coloração e um brilho diferente. Os animais que sofrem de HEB não apresentam icterícia (Rosenberger, 1971, citado em Dawra e Sharma, 2001). À medida que a doença progride a hematúria pode desaparecer completamente (intermitência) e recomeçar de novo semanas ou meses mais tarde.

Segundo a nossa experiência, resultante do contacto com os produtores micaelenses cujos animais estão afectados pela HEB, as crises de hematúria são mais frequentes nas vacas na fase final da gestação, deixando de “urinar com sangue” muitas vezes no pós-parto. Uma nova crise recomeça na gestação seguinte, acompanhando-se muitas vezes de agravamento do estado hígido do animal. Algumas das vacas afectadas pela HEB, em estádios terminais, sucumbem durante os percursos que têm de realizar periodicamente entre as diferentes parcelas de pastoreio (transumância), pertencentes à mesma exploração pecuária.

Na fase terminal (iii) da doença os bovinos apresentam grandes coágulos de sangue na urina e perdem a sua condição corporal, apresentando muitas vezes caquexia,

anemia acentuada e hipoproteïnemia responsável pelo aparecimento de edema submandibular. O fluxo urinário poderá ser interrompido, sobretudo nos bovinos machos, devido à anatomia da uretra: comprimento superior, flexura sigmóide e diâmetro mais estreito que nas fêmeas. Como consequência deste facto podem surgir complicações várias, como: cistite, pielonefrite, hidronefrose e infecções urinárias ascendentes, as quais levam com frequência à morte dos bovinos machos na exploração, sem haver tempo para serem transportados para o matadouro. A mesma situação poderá ocorrer nas fêmeas da espécie, mas com menos frequência.

Em raros casos clínicos de HEB, é possível palpar as lesões vesicais por via rectal. Isto ocorre quando as neoplasias da bexiga são suficientemente grandes e/ou envolvem toda a parede da bexiga, por vezes com invasão dos tecidos e órgãos da cavidade pélvica, incluindo os linfonodos ilíacos internos.

O diagnóstico diferencial da HEB deverá incluir a intoxicação por ingestão de folhas de carvalho, *Quercus douglasii* (Plumlee et al., 1998), cistite e pielonefrite (McKenzie, 2007). Estes últimos casos são normalmente acompanhados de febre, polaquiúria, disúria e presença de pús com turvação na urina. O exame bacteriológico da urina pode revelar a presença de infecção. As infecções agudas por leptospirose do serogrupo *Icterohaemorrhagiae* são relativamente comuns nos bovinos dos Açores, devendo por esta razão, ser incluídas no diagnóstico diferencial da HEB (Borrego, 2006; Pinto et al., 2007). Contudo, as manifestações clínicas de leptospirose são mais comuns em bovinos jovens, o que não acontece na HEB, dando lugar a síndromes hemorrágicas com sintomas similares aos observados nos casos de intoxicação aguda pelo feto comum (Pinto et al., 2007).

A presença de múltiplos tumores na mucosa da bexiga constitui a principal manifestação lesional da HEB (Fig. 1.1). A doença tem distribuição mundial, é de natureza endémica (Smith e Beatson, 1970; Pamukcu et al., 1976; Hopkins, 1986; Bringuier e Jean-Blain, 1987) e está associada à distribuição geográfica do feto comum (género *Pteridium*); parece ser resultante da ingestão prolongada pelos bovinos de toxinas desta planta infestante das pastagens (Fig. 1.2). A actividade carcinogénica do feto comum é atribuída à presença de ptaquilósido (Pta), um glucósido norsesquiterpenóide, isolado desta planta (Hirono, 1990). O Pta também foi identificado em outras plantas como o *Cheilanthes sieberi* (feto das rochas, existente na Austrália) e *Onychium contiguum* (McKenzie, 2007). O Pta revelou positividade em

15 outras espécies diferentes de fetos quando testados por técnicas de cromatografia em camada fina e pelo teste de Ames (Dawra e Sharma, 2001).



Figura 1.2. Feto comum (*Pteridium aquilinum*). Pastagem dos Fenais da Ajuda (Mar/97). Verifica-se que as extremidades de algumas frondes e rebentos estão cortadas de forma irregular o que representa um sinal de terem sido ingeridas (herbivoria).

Na ISM, os Tbx são identificados durante a inspecção sanitária *post-mortem*, por abertura da bexiga e observação sistemática da mucosa vesical de todos os bovinos abatidos no MISM, sendo esta a única unidade autorizada de abate existente na Ilha.

1.2.1 Importância económica da HEB nos Açores

Estima-se que a HEB custe mais de 650 000 euros por ano ao Governo Regional da Região Autónoma dos Açores (RAA), por compensações financeiras aos produtores com animais portadores de neoplasias e pagamento de seguros, quando os bovinos são aprovados no exame *ante-mortem* no matadouro. Na tabela 1.1 apresentam-se os valores dispendidos em seguros de reses e compensações financeiras atribuídas aos produtores de 2000 a 2006. Foram gastos 4 220 443,7 de euros em seguros e compensações financeiras, o que resultou num dispêndio de mais de 600 mil euros por ano, apenas para doenças neoplásicas dos bovinos. Contudo, este problema está subestimado, visto que nem todos os bovinos afectados por HEB são remetidos para

abate pelos produtores. As perdas resultantes da HEB para os produtores derivam do refugo precoce dos bovinos com perda da produção leiteira, morte na pastagem, perda do valor da carne, gastos em assistência veterinária e na aplicação de herbicidas. Haverá ainda a considerar custos indirectos, difíceis de contabilizar, pelo facto de serem abatidos e reprovados para consumo um elevado número de bovinos portadores de tumores, com eventuais repercussões negativas na imagem perante os consumidores das fileiras da carne e leite açorianos.

Tabela 1.1. Montantes gastos em seguros de reses e em compensações financeiras aos proprietários de bovinos portadores de tumores desde 2000 até 2006.

Ano	Seguro de reses ⁽¹⁾	Compensações financeiras
	€	€
2000	98 569,2	860 000,0 ⁽²⁾
2001	118 832,3	100 000,0 ⁽³⁾
2002	283 758,5	9 300,0 ⁽⁴⁾
2003	363 650,2	94 800,0 ⁽⁵⁾
2004	368 817,9	569 000,0 ⁽⁶⁾
2005	415 197,6	261 750,0 ⁽⁷⁾
2006	398 517,4	283 500,0 ⁽⁸⁾
Total	2 047 343,7	2 173 100,0

Fonte: Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas (IAMA) da Secretaria Regional de Agricultura e Florestas (SRAF); Valor atribuído de 1,55 euros/kg de carcaça de bovino), conforme o disposto no Regulamento do Seguro de Reses (1) Portaria n.º 27/93 de 24 de Junho, artigo 9º. (2), (3), (4) (5), (6), (7) e (8) Portarias da SRAF da RAA relativas aos anos de 2004, 2005 e 2006, respectivamente.

1.3 Caracterização geográfica e económica da Ilha de São Miguel

1.3.1. Geografia

O arquipélago dos Açores é composto por nove Ilhas de origem vulcânica, distribuídas por três grupos: Ocidental (Flores e Corvo), Central (Faial, Pico, São Jorge, Graciosa e Terceira) e Oriental (São Miguel e Santa Maria). Localiza-se no Oceano Atlântico Norte, entre o continente europeu e a América do Norte (Fig. 1.3) estando as suas Ilhas dispersas entre os 36 e os 39º de latitude Norte e os 24 e os 31º de longitude Oeste. Dista cerca 1 500 Km do continente europeu, 1 450 Km do Norte de África e 3 900 Km da América do Norte (PRORURAL, 2007).

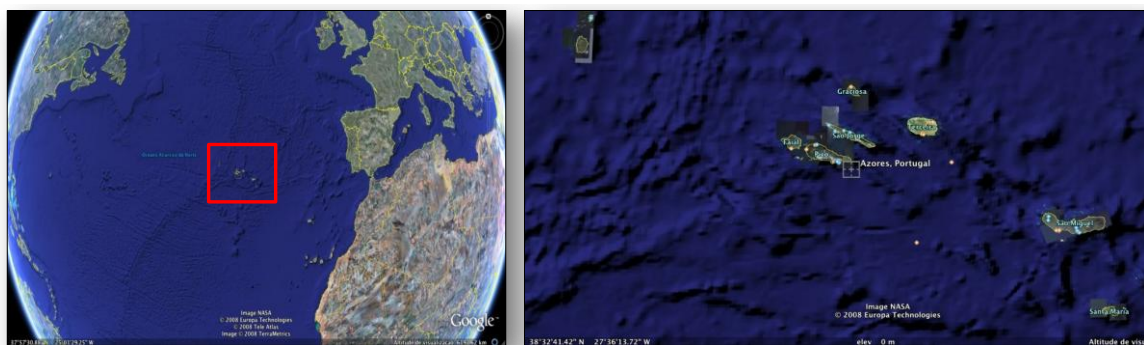


Figura 1.3. Localização geográfica do arquipélago dos Açores: o continente europeu e africano e a América do Norte (quadrado vermelho na imagem da esquerda); grupo ocidental, central e oriental das ilhas açorianas na imagem da direita (Fonte: *Google Earth*, 2008).

A área de superfície total do arquipélago é de 2 332 km², sendo a ISM, a maior com uma área de 760 km². O clima é temperado húmido, chuvoso, com uma precipitação anual compreendida entre os 900 e os 3 000 mm; apresenta temperaturas do ar moderadas com uma média anual de 17º C, com amplitude térmica anual e diária reduzida (máximo de 10º C). O clima varia em função da altitude, sendo frio oceânico nas regiões com altitudes elevadas, onde a pluviosidade é muito intensa (PRORURAL, 2007). Registam-se apenas pequenas diferenças entre o Verão e o Inverno, sem ocorrência de geadas a altitudes inferiores a 600 metros. As pastagens localizadas abaixo dos 200 metros de altitude apresentam períodos secos de fraca pluviosidade, associados a escassez forrageira. Mais de 50% da superfície da ISM é montanhosa. Os solos são do tipo Andossolos, com pH ácido (pH 5.5 a 6.5) e são normalmente carenciados em azoto, fósforo, e cobalto (Oliveira, 1989; SREA, 1998).

1.3.2. Aspectos económicos e estrutura produtiva

A economia dos Açores é baseada na agropecuária, sendo a produção leiteira e os lacticínios o mais importante sector económico, o qual emprega cerca de 17,6% da população activa total (SREA, 1998). Destaca-se que 95% da superfície agrícola útil (SAU) da RAA é ocupada por pastagens, prados e forragens (PRORURAL, 2007). Na ISM cerca de 83% da SAU (41 076 ha) é ocupada por pastagens permanentes (34 124 ha), compostas por azevém (*Lolium perenne* L.) e trevo branco (*Trifolium repens* L.). Existem actualmente mais de 100 000 bovinos na ISM dos quais cerca de 50 000 são vacas leiteiras (RGA, 1999, SNIRA, 2007), quase na totalidade da raça Holstein-Friesian, distribuídas por cerca de 1 540 explorações (POSEI vacas leiteiras, 2009). Apesar da tendência actual ser a fixação das explorações num só local, como se verifica nas explorações mais modernas e de maior dimensão, a grande maioria das explorações de bovinos leiteiros nos Açores, são normalmente fragmentadas e

dispersas em pequenas parcelas de pastoreio. As vacas leiteiras deslocam-se regular e frequentemente entre as diferentes parcelas de terreno de pastagem que compõem a exploração, processo designado por transumância. A ordenha é feita em unidades móveis que acompanham as manadas. As vacas em lactação são suplementadas com alimento concentrado na hora da ordenha. Nas unidades fixas as vacas são estabuladas temporariamente durante o período da ordenha, com distribuição de alimentos concentrados e forragem em sistemas “unifeed”. Estes últimos têm vantagens em termos de poupança de mão-de-obra, porque permitem uma alimentação mais equilibrada e racional, através da mistura mais criteriosa do alimento concentrado, forragem, alimento fibroso e outros suplementos alimentares adequados a cada fase do ciclo produtivo da vaca.

O facto das explorações se encontrarem pulverizadas em pequenas parcelas, exige mais mão-de-obra, implica maior dispêndio energético, dificulta a ordenha em boas condições higiénicas e como consequência representa um importante factor de estrangulamento económico e de modernização das estruturas produtivas.

1.3.3 Evolução histórica e ciclos produtivos

Segundo o cronista Gaspar Frutuoso, o descobrimento e a colonização das Ilhas de São Miguel (ISM) e Santa Maria ocorreu no primeiro quartel do século XV, sendo o ano de 1444, o ano do “achamento” da ISM (Brito, 2004). O Infante D. Henrique foi o promotor do reconhecimento e da colonização das Ilhas.

As primeiras culturas introduzidas foram os cereais (trigo e cevada), legumes, cana sacarina, pastel (*Isatis tinctoria*) e árvores de fruto. Nas zonas menos aráveis e de baixa altitude foi introduzida a vinha. Até ao século XIX, o trigo foi a cultura predominante, embora com grandes oscilações devidas não só a factores climáticos, como ao esgotamento dos solos. A cultura da batata-doce foi introduzida em 1540, destinada à alimentação e ao fabrico do álcool. Seguiu-se a cultura do inhame no último quartel do século XVI. Estas duas últimas culturas persistem até aos dias de hoje, embora em regime de produção de subsistência e destinadas apenas ao consumo local.

A cultura do pastel, uma planta utilizada na produção de um pigmento azul utilizado na indústria têxtil, foi a primeira cultura industrial da ISM e do arquipélago. Teve escoamento garantido para a Flandres, Inglaterra e Espanha, desde 1490 até à segunda metade do século XVII, altura em que começou a sofrer a concorrência do anil, proveniente das colónias espanholas da América do Sul. A estocada final nesta

cultura e neste ciclo produtivo ocorreu entre 1670 e 1700 devido à produção de anilinas sintéticas pelos holandeses.

A partir do terceiro quartel do século XVI iniciou-se um novo ciclo económico, o dos citrinos, com especial preponderância para a cultura da laranja. A exportação iniciou-se em 1714 (Brito, 2004) para o Norte da Europa (especialmente Inglaterra) e América do Norte, tendo sido considerada uma das maiores riquezas da ilha até meados do século XIX. Terminou este ciclo, devido ao aparecimento de uma doença provocada pela cochonilha (*Coccus hesperidum*), por volta de 1843 (Sampaio, 2006), com consequências socioeconómicas muito gravosas para a economia açoriana. Contribuiu para o golpe final nesta cultura, a concorrência da laranja de Múrcia e de Valência, devido ao facto de estas regiões espanholas estarem mais próximas dos mercados, terem menores custos de transporte e terem de pagar menos impostos à coroa (Sampaio, 2006).

Tabela 1.2 Principais ciclos produtivos da Ilha de São Miguel e do arquipélago dos Açores: períodos em que se verificou preponderância de uma cultura face às demais (Fonte: Brito, 2004; Sampaio, 2006)

Culturas	Início	Final	Principais causas de declínio
Trigo	Século XV	Século XIX	Esgotamento dos solos
Vinha	Século XV	Século XX	Oídio, filoxera e míldio
Pastel	1490	Final do séc. XVI	Concorrência do anil e das anilinas sintéticas
Laranja	1580	1843	Cochonilha (<i>Coccus hesperidum</i>)
Agropecuária	Século XX (2º quartel)	?	Globalização? Custos energéticos? Pulverização das pastagens?

A este período aplica-se a sentença de Gaspar Frutuoso: “*como nunca vem um mal só a esta vida, sem vir acompanhado por muitos*”, pois logo a seguir ao final do ciclo da laranja, chega ao fim o ciclo da vinha, devido ao aparecimento de pragas como o oídio, seguindo-se a filoxera e o míldio.

Em meados do século XVII foi introduzida a cultura do milho que veio revolucionar a agricultura da Ilha, do arquipélago e mesmo do Continente português (Brito, 2004), tornando-se a cultura dominante até ao final da década de 60 do século passado. Esta cultura veio ocupar o lugar outrora ocupado pelo trigo. Assim, desde o século XIX até ao início da década de 70 (séc.XX) as “*freguesias*” e os “*lugares*”, estiveram cobertos por um “*mar*” de milho, alternando com a cultura do tremço, também designada por

“outonos”, usado como fertilizante das culturas cerealíferas e para alimentação do “gado grosso” (bovinos).

Durante o século XIX multiplicaram-se as culturas industriais, como o tabaco (1815), o ananás, cultivado inicialmente como planta ornamental, o chá (1878) e já no século XX (1904) a beterraba sacarina, as quais persistem com maior ou menor sucesso até aos dias de hoje (Brito, 2004 e Sampaio, 2006).

A introdução de bovinos ocorreu desde a colonização de uma forma incipiente no início, tipo cultura de subsistência, mas sempre com a percepção por parte dos primeiros produtores que o gado se multiplicava “*em grande maneira*” (Brito, 2004). Em 1776 começa a introdução de raças qualificadas, ocorrendo a importação de gado de aptidão leiteira em 1842, tendo vindo os primeiros reprodutores dos Estados Unidos da América (EUA) e da Holanda. Apesar da criação de gado bovino ter despertado grande interesse nas famílias mais abastadas da época, um grande produtor local apontou graves deficiências na sua criação: “*a mesquinhez com que o gado era tratado*”, o não aproveitamento dos estrumes e o desconhecimento das pastagens artificiais (Brito, 2004). Estas lacunas foram sendo gradualmente colmatadas no início e meados do século XX. As arroteias passaram acima dos 400 metros de altitude, transformando terrenos outrora incultos em pastagens, melhoraram-se os prados existentes, sobretudo com a sementeira de azevém (*Lolium perenne*) e introdução de várias cultivares de trevos (*Trifolium repens*). Nas pastagens de maior altitude constituíram-se consociações de azevém, trevo branco e *Dactylis glomerata* e uma pequena percentagem de *Lotus uliginosus* (Sampaio, 2006).

O inconveniente da heterogeneidade das raças de bovinos introduzidas inicialmente (Normanda, Shorthorn, Jersey e Ayrshire) foi-se eliminando com uma progressiva “*holandização*” dos bovinos leiteiros da raça Frísia. Esta raça de bovinos revelou melhor adaptabilidade às condições edafo-climáticas locais e evidenciou ser superior em termos de produtividade.

A melhoria do efectivo bovino leiteiro da ISM iniciou-se em 1928, com a importação de um touro e de 2 novilhas Holstein dos EUA. A partir dessa data ocorreram várias importações de animais de linha Frísia, da Holanda e Inglaterra, e Holstein dos EUA, tendo em vista a criação de um bovino que, para além das aptidões leiteiras, garantisse uma qualidade de carcaça aceitável, visto que boa parte dos animais jovens, sobretudo bovinos machos, se destinavam ao abastecimento em carne das populações.

Em 1955, foram criados os Postos Zootécnicos, em várias ilhas, para que se garantisse a melhoria do efectivo bovino leiteiro, através de um “Regulamento da

Reprodução”, com registo genealógico e contraste leiteiro de várias manadas (Sampaio, 2006). Em 1968 foi construído o Centro de Bovinicultura, no coração da principal bacia leiteira dos Açores: a freguesia dos Arrifes. Esta infra-estrutura, destinada principalmente à criação de reprodutores seleccionados, que eram distribuídos pelas manadas de vários produtores da ISM, juntamente com a criação de indústrias de lacticínios modernas e bem apetrechadas, deram um grande impulso na bovinicultura de leite e contribuíram decisivamente para o estabelecimento pleno do “*ciclo da vaca*”, que perdura até aos dias de hoje. Foram assim criadas as condições para um aumento significativo do efectivo pecuário leiteiro que atingiu na última viragem do século o seu apogeu (Sampaio, 2006). Actualmente, acima dos 200 metros de altitude não parece ser viável a introdução de outras culturas alternativas à Agropecuária. Acresce ainda que este sector económico apresenta algumas fragilidades estruturais que condicionam o seu desenvolvimento e competitividade, como a fragmentação das explorações em diferentes parcelas de pastagem por unidade produtiva, maus caminhos de penetração e de acesso às pastagens, ausência de electricidade e água potável num número considerável de explorações, elevadas taxas de analfabetismo ou baixo nível de escolaridade da generalidade dos produtores açorianos, escassez e carestia de mão-de-obra, aumento constante dos custos dos factores de produção, sem que se tenha registado aumento concomitante do valor dos bens produzidos (leite e carne) nos últimos anos. A sobrevivência de muitas explorações é assegurada ficticiamente pelas ajudas comunitárias do tipo “*POSEI vacas leiteiras*”, indemnizações compensatórias, etc., as quais não podem garantir a sustentabilidade do sistema produtivo a médio e a longo prazo.

Os parâmetros de exigência de qualidade impostos pela actual grelha de classificação do leite, como a contagem de células somáticas e o teor microbiano, têm contribuído para a “asfixia” e corrosão económica de muitas explorações. Estas não conseguem assegurar os patamares de exigência impostos pela legislação em vigor e vão, lentamente, perdendo rentabilidade, levando muitas vezes à desistência dos produtores de menor dimensão. Os bovinos leiteiros e as terras de pastoreio têm sido incorporados em outras explorações de maior dimensão e com uma estrutura produtiva mais organizada. Este fenómeno tem vindo a acentuar-se nos últimos anos, como provam os dados do “*POSEI vacas leiteiras*” apresentados na Tabela 2.6.

Nos últimos anos foram construídas numerosas infra-estruturas hoteleiras nas principais Ilhas açorianas, indiciando o aparecimento de um novo ciclo económico: o da hotelaria e turismo. Este apresenta-se como a principal indústria do futuro, mesmo à escala Global. As ilações e ensinamentos que podemos tirar deste breve resumo

histórico dos Açores, é que o actual ciclo da Agropecuária deve ser preservado e fortalecido, sob pena de ser considerado num futuro próximo como mais um “*ciclo*” que terminou, com consequências socioeconómicas sempre gravosas para as populações. O final dos ciclos económicos gerou sempre grandes problemas, por falta de alternativas viáveis de empregos, sendo a emigração para outras paragens, como o Brasil desde o início da colonização até ao século XX e América do Norte (EUA e Canadá), em meados do século XX, a resposta ou saída natural para estes períodos de crise.

“O homem inteligente aprende com os seus próprios erros, o sábio aprende com os erros dos outros” Augusto Cury, 2004.

1.4 Estado actual dos conhecimentos sobre os factores etiopatogénicos da hematúria enzoótica bovina

A literatura científica disponível sobre a HEB aponta a ingestão prolongada das toxinas do feto comum, género *Pteridium* e do *Cheilantis siebieri* (feto das rochas na Austrália), como a principal causa para a doença (Price e Pamukcu, 1968; Bringuier e Jean-Blain, 1987; Dawra e Sharma, 2001), seguindo-se outros factores como a infecção pelo vírus da papilomatose bovina (BPV) do tipo 2; (Campo et al., 1992).

Outros factores etiológicos, como as carências em minerais, parecem poder estar envolvidos, de forma directa (i) ou indirecta (ii), na génese das neoplasias vesicais observadas na HEB. No primeiro caso (i), supõe-se que haja falência ou disfunção dos mecanismos intra-celulares preventivos e/ou reparadores das lesões de ADN, induzidas por xenobióticos (agentes químicos exógenos estranhos ao organismo), ou por excesso de formação de radicais livres de oxigénio e de azoto – com stresse oxidativo; entre estes mecanismos reparadores do ADN destacam-se as selenoproteínas como a glutathione peroxidase, uma metalo-enzima dependente e indicadora do estado em selénio do organismo (Keen e Graham, 1989; Zhuo e Diamond, 2009); no segundo caso (ii), pressupõe-se que as carências minerais em determinados elementos como o fósforo (P) e o cobalto (Co) induzam um comportamento alimentar desviante, ou perversão do apetite nos bovinos (Naylor e Ralston, 1991; McDonald et al., 1995), levando ao consumo do feto comum e respectivas toxinas influenciando indirectamente a carcinogénese. Esta planta infestante das pastagens é muito rica em P, comparativamente a outras plantas forrageiras como o azevém e o trevo branco (Pereira, 1993). As carências em fósforo,

cobalto, selênio, iodo, zinco e cobre são comuns nos bovinos do arquipélago dos Açores (Barbosa, 1949; Toste, 1953; Brito, 1984; Pinto, et al., 2007; 2008).

Por conseguinte, no âmbito da génese da HEB consideraram-se e desenvolveram-se com particular relevância três factores etiológicos: i) toxicidade pelo feto comum; ii) oligoelementos e carcinogénese e iii) influência dos vírus da papilomatose bovina (Figura 1.4).

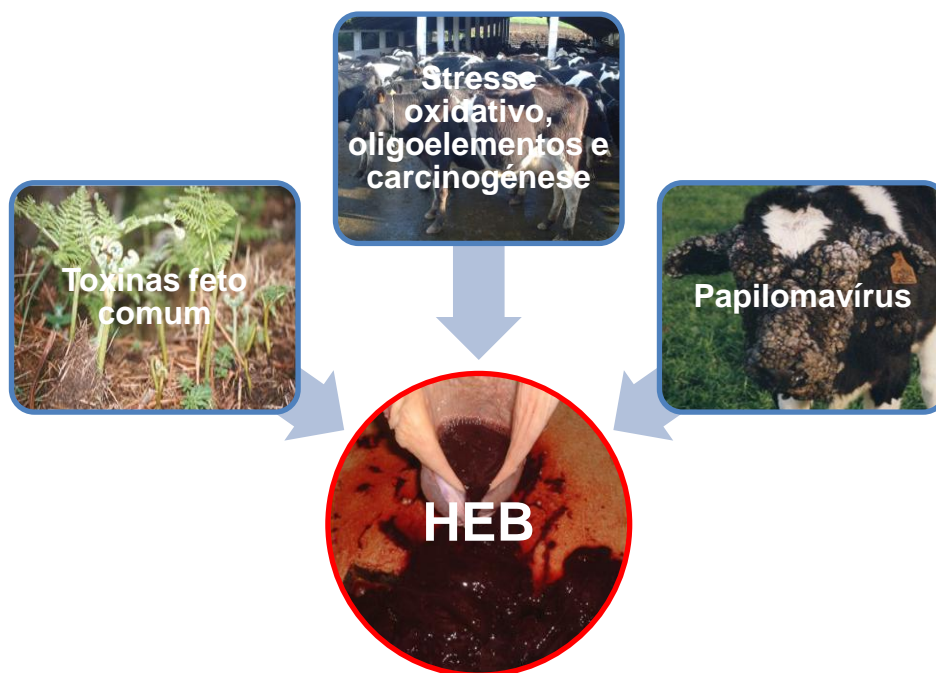


Figura 1.4. Principais factores etiopatogénicos da hematuria enzoótica bovina.

1.4.1. Toxicidade provocada pelo feto comum

O feto comum é uma das cinco plantas mais abundantes no planeta (Smith e Seawright, 1995). As únicas limitações para a sua expansão parecem ser as temperaturas e secura extremas das regiões polares e desérticas. Estima-se em 1% o aumento médio anual da cobertura vegetal por esta planta no Reino Unido, chegando a atingir valores superiores a 3% em algumas regiões britânicas (Taylor, 1986; Taylor e Smith, 1994). Este processo tem sido facilitado pelas alterações ocorridas na exploração e utilização da terra que se verificaram nos últimos anos (Hopkins, 1990). O abandono de determinadas culturas e de terrenos agrícolas menos férteis, a extensificação e a desflorestação, intencional ou provocada por incêndios, têm facilitado a expansão desta planta daninha, que é actualmente considerada uma das principais pragas do Reino vegetal (Page, 1986; Santos, 1990).

Com uma experiência de vida com sucesso na Terra de cerca de 300 milhões de anos (IARC, 1986; Taylor, 1994), a planta do género *Pteridium* criou excelentes mecanismos de sobrevivência, tornando-se um oportunista ecológico versátil e agressor (Taylor e Smith, 1994), recorrendo a várias estratégias para garantir a sua sobrevivência (Page, 1986): 1- Elevada resistência à doença; 2- Baixa palatabilidade, tanto para herbívoros em pastoreio como para artrópodes; 3- Efeitos alelopáticos, impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas competidoras; 4- Grande capacidade de propagação, por libertação de quantidades prodigiosas de minúsculos esporos; 5- Longevidade vegetativa acentuada, visto que os rizomas podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo; 6- Grande tolerância edafo-climática; 7- Adaptação ao fogo, por resistência dos esporófitos a queimaduras intensas e pela localização subterrânea do rizoma que multiplica a planta por via vegetativa (Fernandes e Fernandes, 1983); 8- Mutualismo com insectos; 9- Polimorfismo genético e citológico, que lhe confere grande adaptabilidade a diferentes ambientes.

Esta planta infestante encontra-se largamente disseminada por algumas pastagens da ISM e do arquipélago dos Açores em geral (Wilmans e Rasbach, 1973; Pinto, et al., 2000; 2004; Silva, 2001).

Os diversos metabolitos existentes no feto constituem um verdadeiro arsenal bioquímico (Cooper-Driver, 1976), salientando-se pelos seus efeitos patogénicos nos animais, uma tiaminase, uma toxina da medula óssea (Evans, 1976; 1986) e o glicósido sesquiterpenóide, ptaquilósido (Pta) com propriedades mutagénicas, clastogénicas e cancerígenas (Niwa et al., 1983 a, b; Van der Hoeven et al., 1983). Toda a planta é tóxica (Tokarnia et al., 1967, 1976) incluindo os rizomas e os esporos (Villabolo-Salazar et al., 1994) quando ingeridos ou inalados pelos animais; a fome associada a períodos de escassez alimentar é o factor determinante do seu consumo (Hannam, 1986; Lawson, 1989; Pinto et al., 1996a; 1996b). Os animais manifestam maior apetência pelos rebentos e frondes tenras da planta (Bringuier e Jean-Blain, 1987), que são as porções que apresentam a maior concentração de Pta (Fig. 1.5), (Smith et al., 1993; Smith, 1997).

Foram descritas e caracterizadas nos ruminantes e monogástricos domésticos, cinco síndromes associadas à ingestão do *Pteridium spp.* (Smith, 1990; 1997): (1) Encefalomalácia por deficiência em tiamina, (2) síndrome hemorrágica aguda ou intoxicação aguda pelo feto comum, (3) retinopatia em ovinos, também conhecida por “cegueira brilhante” (*bright blindness*), (4) carcinomas do tubo digestivo e (5) hematúria

enzoótica. A quantidade de biomassa de feto comum disponível, o seu conteúdo em toxinas, a fase do crescimento da planta, a época do ano, a quantidade ingerida e a duração do seu consumo, bem como a espécie animal, sexo e idade dos animais expostos podem influenciar o desenrolar do processo tóxico subsequente (Smith e Pinto, 2006).

Encefalomalácia por deficiência em tiamina

A encefalomalácia por deficiência em tiamina induzida por uma tiaminase do tipo 1 existente no feto comum foi observada em cavalos (Evans et al., 1951a, b) e porcos (Evans et al., 1963), que consumiram a planta em condições naturais. Caracteriza-se pelo aparecimento de anorexia e ataxia nos estádios iniciais (reversível pela administração de tiamina), seguindo-se opistótonus, convulsões e morte, com presença de lesões cerebrais irreversíveis (Evans, 1976; Smith e Pinto, 2006). Este síndrome foi reproduzido experimentalmente em ovinos (Evans et al., 1975; Bakker et al., 1980). A actividade da tiaminase é mais elevada nos rizomas, especialmente no Verão e nos rebentos do feto comum, diminuindo com a maturidade da planta (Smith e Pinto, 2006).

Intoxicação aguda pelo feto comum

A intoxicação aguda pelo feto comum (IAF) tem sido observada predominantemente em vitelos após o desmame (Pinto et al., 2007) e esporadicamente em bovinos e ovinos adultos (Smith et al., 2000). A IAF resulta de uma alteração degenerativa das células em crescimento mais rápido do organismo, especialmente da medula óssea e do epitélio intestinal (Evans et al., 1982). A degenerescência e necrose das células epiteliais da laringe e do tubo digestivo, especialmente faringe e intestino delgado, levam ao desenvolvimento das formas laríngicas e intestinais da doença (Tokarnia, 1967; Evans et al., 1982; Smith e Pinto, 2006).

A nível medular, verifica-se depleção de megacarioblastos, dando lugar ao aparecimento de trombocitopenia acentuada e crise hemorrágica aguda. Esta manifestação lesional integra um quadro mais abrangente de aplasia e hipoplasia medular, observado na IAF, em que também são afectadas as células precursoras dos granulócitos e dos eritrócitos, provocando leucopenia acentuada, com consequente aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas e anemia (Smith, 1990; Xu, 1992; Pinto et al., 2007). Nos bovinos verifica-se neutropenia intensa com linfocitose relativa, enquanto nos ovinos tem sido referida linfocitopenia profunda (Sunderman, 1987).

Os quadros hemorrágicos que têm sido observados em bovinos jovens explorados em regime de pastoreio, em parcelas infestadas pelo feto comum, na ISM - Açores são as manifestações clínicas mais evidentes da IAF (Pinto et al., 2007).

O processo de IAF, com manifestações evidentes de crise hemorrágica aguda, demora geralmente mais de três semanas a desenvolver-se. Este facto possibilitou a utilização dos ruminantes em pastoreio para a erradicação do feto comum por destruição dos rebentos tenros da planta infestante nos locais infestados. Este método, embora desaconselhado à luz dos conhecimentos actuais, foi largamente utilizado na Nova Zelândia no século passado, para limpeza das áreas infestadas pelo feto comum, valorizando-as e possibilitando a sua utilização posterior como áreas de pastoreio (Smith e Pinto, 2006). Neste método de controlo do feto comum foram predominantemente utilizados ovinos, por serem mais resistentes aos efeitos tóxicos do *Pteridium* spp. que os bovinos.

Retinopatia ou “cegueira brilhante” dos ovinos

Em algumas áreas do Reino Unido os ovinos alimentados com feto comum desenvolveram atrofia progressiva da retina que resultou em cegueira. Esta atrofia da retina conduz a aumento da reflectância do tapete lúcido, observado em condições de semi-obscuridade, processo designado por “cegueira brilhante” (*bright blindness*). Foi também observado estenose dos vasos da retina (Watson et al., 1972a e 1972b). Esta síndrome foi reproduzida experimentalmente, em 1993, por um grupo de investigadores japoneses, utilizando ptaquilósido (Pta) administrado por cateter e por via intravenosa (Yamada et al., 2007).

Carcinomas do tracto digestivo superior

Foram referidos tumores da nasofaringe, esófago e pré-estômagos de bovinos que pastoreiam em áreas infestadas por *Pteridium* spp., no Brasil, Quênia e Reino Unido (Dobereiner et al., 1967; Jarrett et al., 1978). Os tumores do tracto digestivo superior, embora pouco frequentes, têm sido observados nos bovinos explorados nos Açores (Pinto et al. 1996b, 2001). Estas neoplasias devem-se à actuação concertada dos vírus da papilomatose bovina tipo 4 (BPV-4) conjuntamente com a ingestão de carcinogénios do feto comum (Campo, 1997). Os ovinos também desenvolvem este síndrome, manifestando-se por fibrosarcomas da mandíbula, maxilar e lesões papilomatosas do rúmen (Robinson, 2006; Smith e Pinto, 2006).

Hematúria enzoótica dos bovinos e ovinos

A hematúria enzoótica deve a sua designação às manifestações clínicas e epidemiológicas exibidas por esta doença: presença de sangue na urina, carácter endémico e presença de múltiplos tumores na mucosa da bexiga. Alguns destes tumores têm natureza epitelial e outros são de origem mesenquimatosa, predominantemente vascular; estes últimos originam com frequência hemorragias intra-vesicais (Carvalho et al., 2006; Smith e Pinto, 2006).

Reprodução experimental das síndromes provocadas pelo feto comum ou pelo ptaquilósido

A administração oral de *Pteridium spp*, em condições experimentais, induziu (1) deficiência em tiamina em cavalos e em roedores, (2) a doença hemorrágica aguda em bovinos (IAF), (3) a retinopatia em ovinos, (4) neoplasias em ruminantes e em animais de laboratório, principalmente do tracto digestivo e (5) hematúria enzoótica nos ruminantes (IARC 1986; Smith, 2004).

A administração de Pta a um vitelo provocou trombocitopenia acentuada e hipoplasia da medula óssea como se verifica na IAF, contudo não foi reproduzida a crise hemorrágica, normalmente observada em condições naturais (Hirono et al., 1984c). A degenerescência neuro-epitelial progressiva da retina tem sido reproduzida por fornecimento de feto comum na alimentação dos ovinos (Watson et al., 1972b), ratos e coelhos (Smith, 2004) e ainda pela administração de Pta directamente no intestino delgado dos ovinos (Hirono et al., 1993). A alimentação dos bovinos com feto comum tem reproduzido as síndromes carcinogénicas anteriormente descritas nesta espécie (Rosenberger e Heeschen 1960, citado em Smith, 1984; Pamukcu et al., 1967); de forma similar, foram induzidos carcinomas da bexiga nos ratos (Hirono et al., 1987; Smith et al., 1988) e nos porcos da Índia (Bringuier et al., 1995).

Têm sido produzidas experimentalmente neoplasias em outros órgãos, tais como o íleo, glândula mamária e pulmões de roedores (Pamukcu e Price 1969; Evans, 1986; Smith et al., 1988). Para além da duração da exposição ao feto comum, a idade dos animais também parece influenciar a susceptibilidade aos carcinogénios. Assim, ratos com idades compreendidas entre as 4 e as 10 semanas, foram mais susceptíveis à formação de tumores do que os ratos mais velhos, de 13 a 18 meses (Evans, 1968). Contudo, não foi demonstrada qualquer relação com a idade na indução experimental de tumores da bexiga em bovinos pela ingestão prolongada do feto comum (Pamucku et al., 1967).

A administração oral de Pta induziu a formação de tumores de bexiga e do intestino delgado em ratos (Hirono et al., 1984a, b). A administração parenteral de Pta ativado induziu, por sua vez, a formação de carcinomas mamários em ratos (Shahin et al., 1998a).

Toxinas e carcinogénios do feto comum e de outros fetos

Vários grupos taxonómicos de *Pteridium* têm sido comparados para determinar se existem diferenças na concentração de Pta. Todos os grupos examinados continham Pta, embora tenham sido encontradas grandes variações na sua concentração. As maiores concentrações de Pta têm sido associadas a elevadas latitudes no leste da Austrália (Smith et al., 1994a) e a elevadas altitudes na Costa Rica (Villalobos-Salazar et al., 2000) e Venezuela (Alonso-Amelot, 2000). Na Nova Zelândia (NZ) foram identificadas de forma consistente, grandes diferenças na concentração de Pta entre duas localizações geográficas diferentes (Smith et al., 1988, 1993). O feto comum colhido na vizinhança de Hamilton (NZ - Ilha do Norte) apresentou valores de Pta consistentemente mais baixos ($<100 \mu\text{g g}^{-1}$) que os fetos colhidos cerca de 250 km para Sul de Hamilton, numa área onde a HEB é frequente e os valores de Pta foram mais elevados (frequentemente $>2000 \mu\text{g g}^{-1}$). As diferenças nos valores de Pta foram mantidas durante três anos consecutivos quando os rizomas do feto comum foram transferidos para uma estufa convencional com mudanças no tipo de solo e no ambiente (Smith et al., 1992). Ensaio realizados com ratos demonstraram que quando se forneciam “pellets” de feto comum, preparados a partir destas duas fontes, se verificavam diferenças substanciais na sua capacidade carcinogénica (Smith et al., 1988). Estes dados sugerem um componente genético associado às diferentes concentrações de Pta no feto comum, ou algum outro factor, tais como um endófito que tenha sido transferido para os rizomas (Smith et al., 1988).

As concentrações de Pta são mais elevadas nas partes tenras e em crescimento do feto comum, como são os rebentos e as frondes imaturas (Fig. 1.5). As amostras colhidas de frondes sucessivamente mais maduras e mais próximas da base apresentaram valores mais baixos de Pta. Os valores mais baixos foram encontrados nas porções verdes escuras e mais duras ao toque das frondes maduras (Smith et al., 1993). Todas as amostras de rizoma e os ápices dos brotos colhidos debaixo da superfície do solo não revelaram presença de Pta. Contudo, rebentos muito imaturos, apenas com alguns centímetros acima da superfície do solo, revelaram a presença de Pta (Smith B. L. dados não publicados). A emergência do ápice dos rebentos e a sua exposição à luz solar pode influenciar a concentração de Pta. Estes resultados estão

em contradição com outros nos quais os rizomas revelaram capacidade para produzir síndromes hemorrágicas agudas nos porcos e nos bovinos (Evans et al., 1961, 1963) ou conterem Pta (Saito et al., 1989; Rasmussen et al., 2003). As razões para esta variação não são conhecidas, mas podem incluir a contribuição de outras toxinas ainda não conhecidas, diferenças regionais na localização do Pta no interior da planta e a diferentes técnicas de colheita. A exposição dos rizomas à luz pode conduzir à produção de Pta, visto que este aparece imediatamente após a emergência da planta. Os níveis mais elevados de Pta no feto comum foram observados na Primavera, decrescendo ao longo do Verão e atingindo os valores mais baixos no Inverno (Smith et al., 1992). O corte do feto comum no final do Verão e o aparecimento subsequente de novos rebentos mostrou que os níveis de Pta aumentam (Leitão, 2006). Esta é uma prática de manejo das pastagens frequentemente utilizada pelos produtores micaelenses. Apenas recentemente, com o recurso, progressivamente mais generalizado, da utilização de herbicidas para o controlo do feto das pastagens se tem invertido esta tendência.

A presença de Pta nos esporos do feto ainda não foi demonstrada. Vários ensaios para determinar a carcinogenicidade dos esporos (Evans, 1986; Villalobos-Salazar et al., 1995) ou testar a sua capacidade para formar aductos de ADN (Povey et al., 1996) têm sugerido a presença de compostos carcinogénicos ou mutagénicos. Os extractos de feto e os seus esporos têm mostrado induzir a formação de aductos de ADN em diferentes tecidos de murganho tratados com Pta activado (Freitas et al., 2001). Este facto sugere a presença de outras genotoxinas ou diferenças no seu metabolismo entre espécies ou dentro da mesma espécie. O Pta não foi encontrado nos esporos do *Pteridium spp* (Saito et al., 1989), quer pelo teste da mutagenicidade quer por cromatografia de camada fina bidimensional.

O feto das rochas australiano, *Cheilanthes sieberi*, que provoca doença hemorrágica aguda e neoplasias na bexiga dos ruminantes, tem mostrado conter Pta nas várias partes da planta, com excepção dos esporos (Smith et al., 1989).

Outros géneros de feto têm mostrado conter Pta (Dawra e Sharma, 2001). O *Cheilanthes sieberi*, revelou causar síndromes de deficiência em tiamina, doença hemorrágica aguda e hematúria enzoótica na Austrália (Clark e Dimmock, 1971; McKenzie, 1978) e contém Pta (Smith et al., 1989).

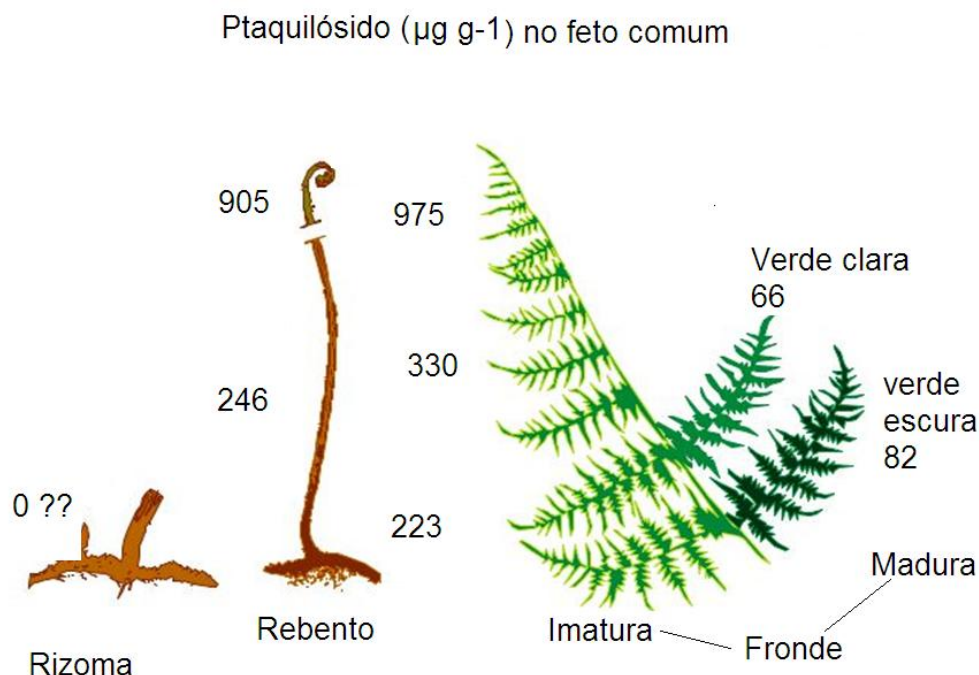


Figura 1.5. Concentração de ptaquilósido ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas diferentes partes do feto comum e em diferentes fases de crescimento da planta. A análise foi realizada de amostras colhidas na mesma altura de um local, na Austrália, onde o feto (*Pteridium esculentum*) crescia de forma uniforme (Adaptado de Smith, 1997).

Vários compostos do tipo-ptaquilósido, ou compostos que evidenciaram propriedades mutagénicas, têm sido também identificados no feto comum e em outras espécies de fetos. O Pta tem sido isolado do *Histiopteris incisa* e do *Pteris cretica* (Saito et al., 1990). Os fetos que revelaram propriedades mutagénicas incluíram o género *Histiopteris*, *Cheilanthes*, *Cibotium*, *Dennstaedtia*, *Hypolepis*, *Pteris* e *Pityrogramma* (Saito et al., 1989). O feto comum também contém outros compostos do tipo do Pta, tais como os glucósidos iludano tipo-B, isoptaquilósido e caudatósido com semelhanças estruturais ao Pta (Castillo et al., 1997). Outros fetos têm também revelado possuir compostos do tipo iludano. O *Hypolepsis punctata* e o *Dennstaedtia hirsta* contêm um número variado de glucósidos sesquiterpenos do tipo iludano (Saito et al., 1990) incluindo o hipolósido A. É provável que estas outras espécies de fetos possam desencadear síndromes similares àsquelas causadas pela ingestão do feto comum, em algumas regiões, tal como se verifica com o *Cheilanthes sieberi* na Austrália.

Antes da descoberta do Pta, outros compostos foram implicados na carcinogenicidade do feto comum. Dois desses, o ácido chiquímico e a quercetina, estão presentes de forma generalizada no Reino Vegetal. Um ensaio realizado com quercetina implicou este composto na génese de tumores intestinais e da bexiga em ratos (Pamukcu et al., 1980). Contudo, trabalhos experimentais subsequentes têm falhado na confirmação desta constatação, tendo sido apenas possível confirmar a sua mutagenicidade (Stoewsand et al., 1984). A carcinogenicidade da quercetina tem sido amplamente discutida e a evidência encontrada demonstrou ser insuficiente (Ito, 1992; Hirono, 1992). Contudo, a quercetina é reconhecida como um co-carcinógeno com o vírus da papilomatose bovina tipo 4, actuando de forma sinérgica na produção de carcinomas do tracto digestivo superior em bovinos (Campo et al., 1999).

Mecanismos de acção do ptaquilósido

Os efeitos biológicos do Pta ao nível do ADN são similares aqueles provocados pelos agentes alquilantes clássicos (Povey et al., 1994). Em condições alcalinas moderadas o Pta converte-se em dienona, a qual pode formar aductos com as bases de ADN (especialmente adenosina em determinadas sequências) por reacção electrofílica, ou formar pterossina B inactiva (Smith et al., 1994b). A formação de aductos de ADN pode resultar em alterações irreversíveis na célula normal, constituindo a primeira fase (iniciação) da génese de uma célula tumoral (Miller e Miller, 1986). A especificidade da localização das neoplasias induzidas pelo Pta pode explicar-se pelas condições alcalinas normalmente observadas nos principais órgãos atingidos: nasofaringe e esófago dos bovinos (pela acção alcalina da saliva), bexiga dos herbívoros e íleo dos roedores (Van der Hoeven, 1983; Smith e Seawright, 1995).

Ojika et al., (1987, 1989) foram os primeiros investigadores a propor que a carcinogenicidade do Pta se desencadeia por lesão inicial do ADN. Estes cientistas mostraram que o Pta forma ligações covalentes (aductos) com o grupo N-3 do mononucleótido adenina na porção mais estreita do anel reactivo ciclopropil (Fig. 1.6). Este mecanismo de actuação do Pta no ADN foi corroborado por outros investigadores (Kushida et al., 1994; Smith et al., 1994b; Prakash et al., 1996; Yamada et al., 2007).

Estudos posteriores revelaram que a alquilação das adeninas ocorre preferencialmente nas sequências 5'-TAG e 3'-A in 5'-AA-3' (Prakash et al., 1996). Acredita-se que em muitas circunstâncias a alquilação do ADN seja a primeira etapa da iniciação da carcinogénese induzida quimicamente. As bases modificadas em códons específicos de um proto-oncogene conduzem a mutações pontuais, as quais,

por sua vez, fazem com que os produtos proteicos tenham efeitos nefastos. Por exemplo, a metil-nitrosourea modifica a guanina (G) no codão 12 levando à sua substituição por adenina (A), fenómeno designado por “transição”, em que ocorre substituição de uma base púrica G por outra base púrica A. Os alquilatos de adenina e o dimetilbenzantraceno activado levam à “transversão”, que consiste na substituição de uma base púrica, adenina (A), por uma base pirimídica, no codão 61 do oncogene H-ras (Kito et al., 1996; Yamada et al., 2007).

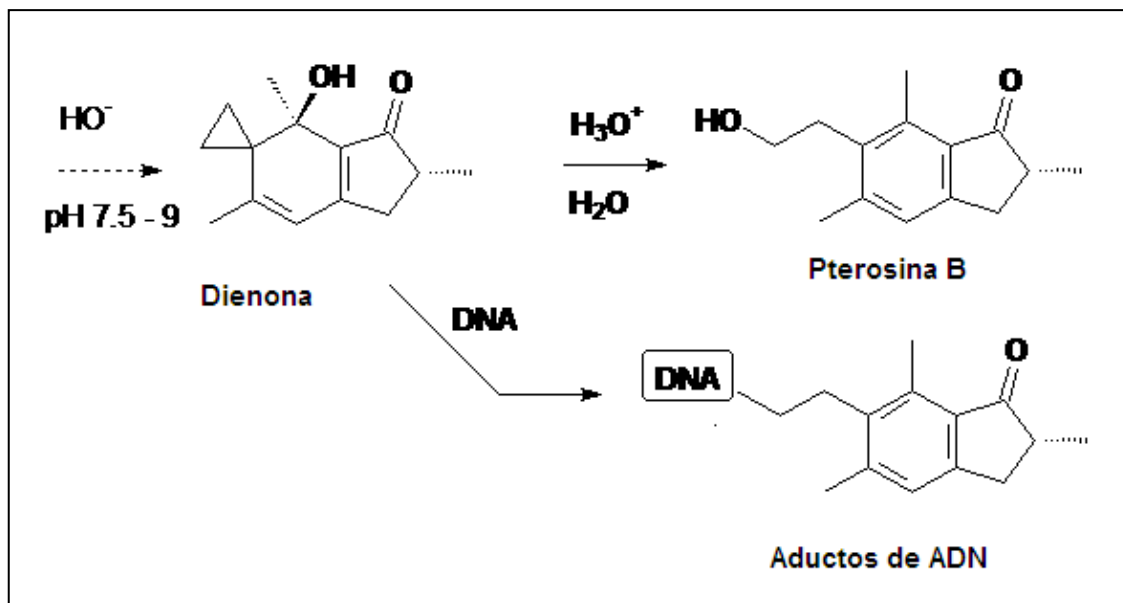


Figura 1.6. O ptaquilósido em condições alcalinas converte-se em dienona a qual induz a formação de aductos de ADN. A alquilação do ADN por acção da dienona leva a alterações na sequência de bases, por depurinação, ruptura da estrutura ribose fosfato dos ácidos nucleicos e a clivagem no ADN. Estas alterações perturbam a transcrição genética (Adaptado de Alonso-Amelot & Avendaño, 2002).

Freitas et al., (2001) mostraram que os aductos induzidos pelo feto comum nos tecidos do rato são diferentes daqueles induzidos pelo Pta activado, no que respeita à mobilidade dos “spots” (ou manchas e/ou pontos que identificam os aductos) na película de revelação fotográfica. O significado deste facto permanece obscuro, pois os aductos são formados em diferentes espécies animais e como resultado da utilização de diferentes metodologias, uma “*in vivo*” e a outra “*in vitro*”. Vitelos alimentados com feto comum revelaram a presença de aductos de Pta-ADN e activação do oncogene H-ras, que alberga a mutação no resíduo de adenina do codão 61 no órgão alvo para o Pta: o íleo (Prakash et al., 1996).

Ratos tratados com Pta activado por via intra-venosa desenvolveram adenocarcinomas da glândula mamária e do íleo (Shahin et al., 1998a,b). Tem sido

demonstrada a presença de aductos de ADN (Shahin et al., 1998a) e mutações H-*ras* no codão 58 e 59 nos tecidos pré-neoplásicos (Shahin et al., 1998c). A importância destas descobertas é reforçada por estudos de mutagénese “*in vitro*”, os quais mostraram que as mutações que ocorrem nos codões 12-13 e codões 59-63 reduzem a actividade da GTPase da proteína *ras* por alteração na sua conformação, a qual, por seu turno, despoleta o crescimento descontrolado das células associadas às neoplasias (Benjamin e Voght, 1991). Foi assim sugerido que a carcinogénese induzida pelo Pta é iniciada pela activação do gene H-*ras*, resultante da formação de aductos de ADN com a dienona que é forma activa do Pta (Shahin et al., 1998c).

O feto comum e a Saúde Pública

O consumo directo ou indirecto dos carcinogénios do feto tem sido associado à génese de carcinomas esofágicos e gástricos em humanos (Hirayama, 1975; Galpin et al., 1990; Marlière et al., 2000). Determinadas populações do Japão e do Brasil, cujos hábitos alimentares incluem o consumo regular de rebentos tenros de fetos, apresentam maior incidência de cancro do esófago e estômago (Marlière et al., 2000).

No Japão os rebentos são fervidos em água e tratados com cinza de madeira ou bicarbonato de sódio para preservar a sua cor, remover o seu sabor amargo e adstringência, devidos ao seu teor elevado em taninos e prunasina (Alonso-Amelot e Avendano, 2002), bem como reduzir a sua toxicidade. Este tratamento tradicional aplicado ao feto comum para uso culinário, tem sido testado e mostrou diminuir mas não eliminar na totalidade a carcinogenicidade desta parte da planta (Hirono et al., 1972; Yamada et al., 2007). Apesar do tratamento térmico e da adição de cinza e/ou de bicarbonato de sódio, uma proporção significativa da população consumidora desta planta apresenta um risco superior de desenvolvimento de carcinomas do esófago: 2,1 e 3,7 vezes mais nos homens e mulheres, respectivamente (Kamon e Harayama, 1975). No Brasil existem evidências epidemiológicas da associação entre o consumo de rebentos de feto comum, localmente conhecido por “samambaia” e maior risco de aparecimento de cancro gástrico e esofágico na população humana (Marlière, et al., 1998); estima-se que o risco de ocorrência destas neoplasias seja 3,4 vezes mais que na população não consumidora de feto comum.

Os rizomas têm também sido considerados um alimento tradicional no Japão (Hirayama, 1975; Alonso-Amelot e Avendano, 2002). O seu amido é extraído e misturado com cinza de madeira como parte do processo de secagem. Os rizomas e os rebentos dos fetos têm sido consumidos em muitas outras partes do mundo,

particularmente pelas populações indígenas da Austrália, Nova Zelândia e América do Norte (Veitch, 1990). Em épocas de grande carestia alimentar na Europa continental e sobretudo nas regiões insulares os rizomas eram colhidos e preparados para fabricar “*pão de feto*” para consumo humano (Fernandes e Fernandes, 1983).

A ingestão de esporos do feto comum pelos animais em condições laboratoriais tem sido associada com o cancro e a presença de aductos nos tecidos (Povey et al., 1994). Contudo, apesar de em determinadas condições ambientais os humanos estarem expostos a elevadas concentrações de esporos, nenhuma ligação foi, para já, estabelecida entre a sua ingestão accidental e o aparecimento de problemas de saúde nas populações (Smith et al., 2000).

O leite de vaca e seus derivados provenientes de animais que pastoreiam em áreas muito infestadas pelo *Pteridium spp*, têm sido apontados como factores de risco de neoplasias em humanos (Villalobos-Salazar et al., 1989), sobretudo naqueles pertencentes a comunidades em que o leite é vendido a retalho na própria localidade de produção, sem diluição prévia no tanque de recolha ou sem processamento tecnológico, como a pasteurização ou ultra-pasteurização (Fenwick, 1989). Ratos alimentados com leite de vaca, cuja dieta incluiu fetos, desenvolveram tumores do intestino delgado, rim e bexiga (Price e Pamucku, 1968). O leite, juntamente com a urina, constituem a principal via de excreção do Pta (Smith, 1997). Foi demonstrada a presença do Pta no leite de vacas consumidoras de *Pteridium spp*. em condições experimentais (Alonso-Amelot et al., 1996, 1998, 2000).

No Norte de Gales, onde o cancro gástrico é particularmente prevalente, registou-se um risco significativamente aumentado ($\times 2,34$) entre as pessoas que passaram a sua infância em áreas infestadas pelo feto comum comparativamente a outras populações controlo (Galpin et al., 1990). Com a implementação de sistemas modernos de colecta e distribuição de leite este risco parece ter desaparecido, porque o leite eventualmente contaminado com as toxinas do feto é diluído em grandes quantidades de leite sem toxinas e é submetido a um tratamento térmico que atenua ou praticamente elimina o risco de toxicidade (Fenwick, 1989). Nas áreas montanhosas da Costa Rica estudos epidemiológicos têm mostrado haver uma correlação positiva entre a prevalência de HEB e o cancro gástrico e esofágico no Homem (Villalobos-Salazar et al., 1989). Têm sido registadas taxas elevadas de cancro gástrico nos humanos que vivem predominantemente nas zonas montanhosas da Venezuela, onde também existe maior infestação por feto comum e maior número de casos de HEB nos bovinos, tendo

sido o leite apontado como o possível veículo para o carcinogénio (Alonso-Amelot e Avendano, 2001).

A ingestão prolongada de leite de vaca por populações não-migratórias, em áreas fortemente infestadas pelo feto comum e em que existam sinais dos bovinos leiteiros terem ingerido a planta, deve ser considerado um factor de risco para a formação de carcinomas do tracto digestivo superior nos humanos. Esta possibilidade é suportada pela evidência de que o Pta está presente no leite das vacas alimentadas com feto comum, pela capacidade de tal leite induzir a formação de cancro nos animais de laboratório (Villalobos-Salazar et al., 1990) e pelo crescente volume de evidências epidemiológicas resultantes de estudos realizados em populações humanas (Alonso-Amelot e Avendaño, 2002) (Tabela 1.4).

A análise dos trabalhos referidos permite estimar que a probabilidade ou o risco *Odds Ratio*, das populações humanas sofrerem de carcinomas do tracto digestivo superior é 2,10 a 3,64 vezes superior nas áreas fortemente infestadas pelo feto comum, comparativamente a áreas livres ou onde as populações não estão expostas ao género *Pteridium*. Este facto aponta como principal factor de risco directo, o consumo dos rebentos tenros da planta e, indirectamente, o consumo de leite de vaca proveniente de áreas onde este é vendido a retalho, as vacas estão expostas ao feto comum e sofrem de HEB (Villalobos-Salazar et al., 1989; Alonso-Amelot e Avendaño, 2002).

Uma estimativa quantitativa mostrou que 8% do total de Pta ingerido pelos bovinos durante um período de 5 dias é eliminado pelo leite durante o mesmo período de tempo (Alonso-Amelot et al., 1998). A correlação entre o teor de iludano existente no feto comum e ingerido e aquele excretado no leite foi linear, com uma variação de 2,4 a 10,0 g por animal e por dia.

Em pequenas explorações de bovinos leiteiros e com baixa tecnologia, como se verifica em alguns países da América Latina, foi estimado que um copo de leite poderá conter entre 0,7 a 1,2 mg de Pta. Isto poderá ocorrer nos períodos do ano em que se verifica penúria alimentar para os bovinos, com escassez de plantas forrageiras e abundância de rebentos verdes, tenros e suculentos do feto comum, podendo esta planta constituir uma alternativa alimentar (Alonso-Amelot e Avendaño, 2002).

Tabela 1.4. Probabilidade ou risco (*Odds Ratio*) das populações humanas sofrerem de carcinomas do tracto digestivo superior em países, ou áreas, onde o feto comum abunda, comparativamente a populações residentes em áreas vizinhas, não expostas ao feto, ou livres da planta (controlos).

Área de estudo	Risco ou <i>Odds Ratio</i>	Referências
• Nariño, Colômbia	• 2,10	• Cuello et al., 1976
• Gwynedd, País de Gales	• 2,52	• Galpin et al., 1990
• Costa Rica	• 2,62	• Villalobos-Salazar et al., 1989
• Zona Central do Japão	• 2,68 ⁽¹⁾	• Kamon e Hirayama, 1976; Hirayama, 1979
• Ouro Preto, Brasil	• 3,63 ⁽¹⁾	• Marlière et al., 1998, 2000
• Zona Ocidental da Venezuela	• 3,64	• Alonso-Amelot e Avendaño, 2001, 2002

⁽¹⁾ Populações que consomem preparados cozinhados de feto comum, normalmente rebentos tenros.

“O *Pteridium aquilinum* é uma planta verdadeiramente prejudicial e, dadas as condições actuais que Portugal atravessa, ela pode tornar-se uma verdadeira calamidade” (Fernandes e Fernandes, 1983).

1.4.3. Stresse oxidativo, oligolementos e carcinogénese

Ocorre stresse oxidativo sempre que há preponderância da produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e/ou de espécies reactivas de azoto (ERA) sobre a capacidade de defesa antioxidante celular (Thannickal e Fanburg, 2000; Klaunig e Kamendulis, 2004). As ERO e as ERA podem interagir com biomoléculas como o ADN, ARN, proteínas e lípidos, levando à sua oxidação, com consequências nefastas para as estruturas celulares, tais como perda da sua integridade, instabilidade genómica, apoptose e alterações celulares (Hussain et al., 2003; Kleczkowski et al., 2006; Theophanides e Anastassopoulou, 2006; Marquez et al., 2007). Evidências científicas crescentes implicam o stresse oxidativo na patogenia de várias doenças como o cancro, diabetes melitus, aterosclerose, doenças neuro-degenerativas, artrite reumatóide e senescência, entre outras (Droge, 2002; Valko et al., 2006).

As reacções de oxidação-redução nos sistemas biológicos são designadas por reacções **redox** e estão na base de numerosos processos bioquímicos. Designam-se por oxidantes, ou pró-oxidantes, os compostos com capacidade para aceitar electrões e por redutores ou antioxidantes aqueles que são doadores de electrões. Nas reacções de oxidação verifica-se perda de electrões e nas reacções de redução há ganho de electrões (Hitt, 1988).

Entende-se por **radical livre** um átomo ou grupo de átomos que possui um electrão desemparelhado na sua orbital externa. Os radicais livres (Tab. 1.5) são constantemente produzidos ao nível intracelular, como resultado do metabolismo aeróbio, e são altamente reactivos com as moléculas biológicas podendo danificá-las (Droge, 2002; Surai, 2002; Hussain et al., 2003; Goswami e Singh, 2006).

Nas últimas duas décadas tem havido um interesse crescente por parte da medicina clínica e experimental no estudo da influência dos radicais livres de oxigénio e de azoto nos mecanismos fisiológicos de regulação celular e na génese de várias doenças, incluindo o cancro (Droge, 2002; Valko et al., 2006). Contudo, apesar dos seus efeitos citotóxicos, tanto o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ou o óxido nítrico (NO^{\bullet}), em baixas concentrações, têm um importante papel fisiológico, funcionando como mensageiros secundários na regulação do ciclo celular, diferenciação, senescência e morte celular programada: apoptose (Droge, 2002; Goswami e Singh, 2006; Valko et al., 2006; Ohsawa et al., 2007).

O ambiente celular redox desempenha um importante papel na sinalização celular, na activação enzimática, na síntese de ADN e ARN, na proliferação e diferenciação celular e na apoptose (Valko et al., 2006).

O ciclo celular é caracterizado por flutuações no ambiente redox da célula, mediado em particular pelas alterações na concentração intracelular de glutatião. A indução ou a inibição da proliferação celular parece depender dos níveis de oxidantes *versus* antioxidantes presentes na célula. Um ambiente mais redutor estimula a proliferação celular, enquanto um ligeiro desvio para a oxidação moderada inicia a diferenciação celular. Um ambiente altamente oxidante leva à apoptose e à necrose celular. Cada fase do ciclo celular é finamente controlada pelo estado redox. Com base nestes factos, considera-se que o cancro é caracterizado por um ambiente celular redutor, havendo um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, desviado no sentido da proliferação celular (Valko et al., 2006). Contudo, os antioxidantes da dieta que penetram o citoplasma, aumentam o estado redutor da célula, combatem as ERO/ERA e são protectores da proliferação celular tumoral (Alonso-Amelot, 2010, comunicação pessoal).

Tabela 1.5 - Espécies reactivas de oxigénio e de azoto mais comuns nas células aeróbias (Fonte: Adaptado de Surai, 2002 e de Kleczkowski et al., 2006)

<i>Radicais</i>	<i>Não-radicais</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido, $O_2^{\bullet-}$ • Hidroperóxido, HOO^{\bullet} • Hidroxilo, $^{\bullet}OH$ • Peroxido, ROO^{\bullet} • Alcoxilo, RO^{\bullet} • Óxido nítrico, NO^{\bullet} • Dióxido de azoto, NO_2^{\bullet} 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxigénio simples, 1O_2 • Peróxido de hidrogénio, H_2O_2 • Ozono, O_3 • Ácido hipocloroso, $HOCl$ • Hipoclorito, OCl^- • Ácido nitroso, HNO_2 • Anião nitroxilo, NO^- • Ácido peroxinitroso, $HOONO$ • Peroxinitrito, $ONOO^-$ • Hidroperóxidos, $ROOH$

As principais fontes endógenas e exógenas de radicais livres encontram-se mencionadas na Tabela 1.6.

O radical superóxido ($O_2\bullet^-$) é o principal radical livre produzido nas células, como consequência da perda de electrões (e^-) a partir da cadeia transportadora de electrões mitocondrial (CTEM) e do ciclo de Krebs (Ohsawa et al., 2007). Em condições fisiológicas normais cerca de 1 a 2% dos electrões que escapam da CTEM convertem o oxigénio molecular O_2 em anião superóxido $O_2\bullet^-$ (Fig. 1.7).

Tabela 1.6 - Fontes internas e externas de radicais livres. Fonte: Adaptado de Surai, 2002

<i>Fontes endógenas</i>	<i>Fontes exógenas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Mitocôndrias • Fagócitos • Xantina oxidase • Reacções com o Fe e outros metais de transição • Vias do ácido araquidónico • Peroxisomas • Exercício • Inflamação • Isquemia e reperfusão 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumo do tabaco • Radiação • Luz ultra-violeta • Poluição • Xenobióticos • Reagentes químicos • Solventes industriais

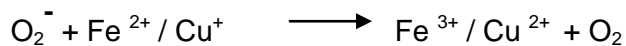
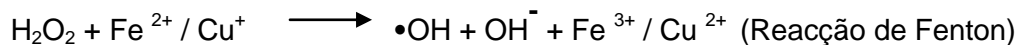
Na Tabela 1.7 apresentam-se as diferentes situações que fazem aumentar o teor de oxidantes no organismo e, como consequência, o stresse oxidativo.

Tabela 1.7 - Causas de stresse oxidativo. Fonte: Surai, 2002 e Kleczkowski et al., 2006

<i>Causas de stresse oxidativo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Nutricionais • Ambientais • Endógenas 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxinas • Excesso de ácidos gordos polinsaturados • Deficiências em vitamina E, Se, Cu, Zn e Mn • Excesso de iões metálicos de transição, como o Fe, Cu, Co, Al, Ni, Cd, Tl, Ag, V, Sn e Cr. • Temperatura, humidade, radiações, etc. • Doenças: bacterianas, víricas, alergias, etc.

O radical hidroxilo é o mais poderoso de todas as ERO oxidantes, pois reage indiscriminadamente com os ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, sendo, por este facto, muito lesivo para as estruturas biológicas (Toyokuni, 2006). Não existe nenhum mecanismo enzimático específico de destoxificação conhecido para o $\bullet OH$

(Kleczkowski et al., 2006; Ohsawa et al., 2007). A superóxido dismutase (SOD) existente nas mitocôndrias (SOD2, Mn-SOD), no citoplasma (SOD1, CuZn-SOD) e no meio extracelular (SOD3, EC-SOD) converte o $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogénio: H_2O_2 (Rasmussen, 2006; Goswami e Singh, 2006). Este composto é seguidamente detoxificado em água (H_2O) por acção da glutatião peroxidase e da catalase. Na presença de metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^+), o H_2O_2 pode sofrer as reacções de Fenton e Haber-Weiss para formar radicais hidroxilo ($\bullet OH$) altamente reactivos (Goswami e Singh, 2006):



O conjunto das duas reacções anteriores é designado por reacção de Haber-Weiss (Surai, 2002).

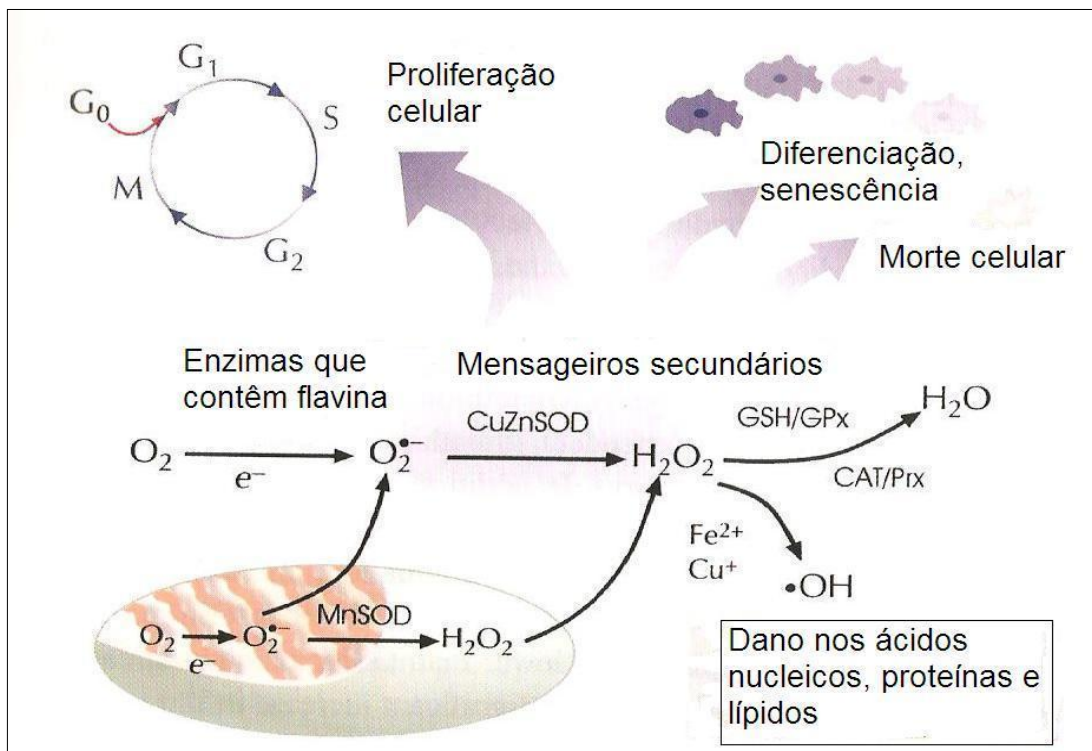


Figura 1.7. Representação esquemática da formação intracelular de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e sua neutralização pelos antioxidantes. As ERO servem como mensageiros secundários na regulação da proliferação celular, diferenciação, senescência e na morte celular. MnSOD = manganês superóxido dismutase mitocondrial; CuZnSOD = cobre, zinco superóxido dismutase citosólica; GSH = glutatião; GPx = glutatião peroxidase; CAT = catalase; Prx = peroxisoma (adaptado de Goswami e Singh, 2006).

A integridade do genoma pode ser danificada por degradação espontânea do ADN (Lindahl, 1993), acção química, radiação, erros de replicação e como resultado da actividade metabólica intracelular normal. Estima-se que em cada célula de mamífero possam ocorrer diariamente mais de 10^4 modificações das bases do ADN (Surai, 2002; Slupphaug et al., 2003; Toyokuni, 2006). Estas alterações no ADN podem provocar mutações que resultam em doença hereditária, cancro e envelhecimento (Slupphaug et al., 2003). Contudo, os mecanismos celulares de reparação do ADN são normalmente muito eficientes no reconhecimento e na reparação dos danos ocorridos (London e Vail, 1996; Slupphaug et al., 2003). A falência dos mecanismos reparadores pode conduzir à formação de alterações genéticas permanentes e irreversíveis no ADN (London e Vail, 1996). A probabilidade de ocorrência e de acumulação de alterações no ADN vai aumentando ao longo da vida, podendo explicar a maior incidência de cancro em idades mais avançadas (London e Vail, 1996; Sugimura, 2000).

Níveis de defesa antioxidante

Durante a evolução, os seres vivos têm desenvolvido mecanismos antioxidantes para se protegerem do efeito das ERO (Surai, 2002; Slupphaug et al., 2003; Kleczkowski et al., 2006). É a presença de antioxidantes naturais nos organismos vivos que os capacita para a sobrevivência em ambientes ricos em O_2 . Cada compartimento sub-celular das células dos mamíferos é protegido por um conjunto de antioxidantes de forma a manter o equilíbrio entre a capacidade de produção de pró-oxidantes e a capacidade antioxidante. Ocorre stresse oxidativo quando os antioxidantes intracelulares não são capazes de neutralizar os pró-oxidantes (Goswami e Singh, 2006).

A primeira linha de defesa contra as ERO é constituída por enzimas e outros compostos de baixo peso molecular com propriedades antioxidantes. Nas enzimas incluem-se as superóxido dismutases, glutatíon reductase e glutatíon peroxidase, catalase, sistemas da tio-redoxina e proteínas que se ligam a metais: transferrina, lactoferrina, haptoglobulina, ferritina, albumina, ceruloplasmina, etc., como o ferro e o cobre com elevado potencial oxidante (Surai, 2002; Goswami e Singh, 2006).

A segunda linha de defesa é composta por antioxidantes de baixo peso molecular como a arginina, as vitaminas E, C e A, carotenóides, ubiquinóis, glutatíon, ácido úrico e polifenóis. Desempenham um importante papel a este nível as enzimas ligadas a minerais como o selénio e o zinco e enzimas antioxidantes como a glutatíon reductase

e as glutatíon peroxidases (Surai, 2002; Rasmussen, 2006). Todos estes compostos são importantes na reparação de danos ocorridos nos ácidos aminados, proteínas e lípidos. Todavia, nenhum destes sistemas celulares tem capacidade de reparar as alterações ocorridas no ADN e, assim, evitar as alterações genéticas permanentes (Rasmussen, 2006). Em compensação, as células desenvolveram mecanismos celulares muito eficazes na reparação de danos oxidativos e outros ocorridos no ADN, que constituem o terceiro nível de defesa antioxidante (Lindahl, 1993; Surai, 2002; Slupphaug et al., 2003). Estes mecanismos baseiam-se em enzimas com capacidade para eliminar e/ou reparar moléculas alteradas e incluem enzimas lipolíticas (lipases), proteolíticas (peptidases ou proteases) e proteínas reparadoras do ADN: ligases, nucleases, polimerases, proteinases, fosfolipases e várias transferases (Surai, 2002).

Na Tabela 1.8 destacam-se os principais factores que podem ajudar a prevenir o stresse oxidativo.

Tabela 1.8 - Factores que aumentam as defesas antioxidantes. Fonte: Surai, 2002 e Kleczkowski et al., 2006

Factores que aumentam as defesas antioxidantes	
<ul style="list-style-type: none"> Nutricionais Ambientais Endógenas 	<ul style="list-style-type: none"> Vitaminas A, E e C, carotenóides, flavonóides, ácido lipóico e óleos essenciais Antioxidantes sintéticos no alimento (beta-hidroxitirato; etoxiquina, etc.) Se, Mn, Zn e Cu Optimização da dieta Optimização das condições ambientais Prevenção das doenças e da inflamação

Papel dos oligoelementos na defesa antioxidante e na carcinogénese

“The same knife cuts bread and fingers”, Peter Surai, 2002

Na tabela 1.9 apresentam-se os oligoelementos essenciais para os mamíferos, com importância vital nas funções de defesa antioxidante, ou, quando em excesso, com acção pro-oxidante e como consequência lesiva das biomoléculas como o ADN.

Ferro

O ferro (Fe) é um elemento químico com número atómico 26 e massa atómica 55,85. É um metal de transição situado no grupo 8B da Classificação Periódica dos Elementos. É o 4º elemento mais abundante na crosta terrestre e, entre os metais,

apenas é superado pelo alumínio (Mcdowell, 2003). É o oligoelemento com maior concentração nos tecidos animais: 2 a 6 g no corpo humano (Toyokuni, 2006).

A deficiência em Fe é rara nos animais em pastoreio, devido à ingestão de quantidades significativas de terra juntamente com a erva; a terra é uma boa fonte de Fe, sobretudo naquela proveniente de solos ácidos e de origem vulcânica como os Açores (Pereira, 1993; Mcdowell, 2003); estimou-se que a ingestão anual de terra, pode atingir 75 kg nos ovinos e 600 kg nas vacas leiteiras da Nova Zelândia (Healey, 1974 citado em Mcdowell, 2003).

O Fe desempenha um papel chave em muitas reacções bioquímicas, devido em grande parte à sua capacidade de intercambiar entre o estado di e trivalente (Fe^{2+} e Fe^{3+}). Todas as 24 enzimas do ciclo de Krebs contêm Fe nos seus centros activos ou actuando como co-factor enzimático essencial (Mcdowell, 2003).

O Fe participa na cadeia mitocondrial de transporte de electrões, integrando os citocromos A, B e C. Estes funcionam como transportadores de electrões, ligando a oxidação do substrato com a redução do oxigénio no metabolismo aeróbio, havendo produção de ATP e formação de H_2O (Mcdowell, 2003). O Fe está presente no grupo heme da hemoglobina, na forma de Fe^{2+} , sendo responsável pelo transporte de oxigénio aos tecidos. Faz parte de importantes enzimas como a catalase, lactoperoxidase no leite e verdoperoxidase nos neutrófilos (Mcdowell, 2003).

Existem evidências consistentes que sugerem um importante papel do Fe na carcinogénese e nas lesões tecidulares induzidas pelos radicais livres (Toyokuni, 2006). Este facto poderá justificar-se pela participação do Fe na reacção de Fenton, com produção de ERO, especialmente o radical hidroxilo altamente lesivo para o ADN, levando a erro na informação genómica. Estas alterações genéticas incluem mutações pontuais, deleções e adições do ADN, bem como translocações cromossómicas. Estes acontecimentos podem provocar activação dos oncogenes (genes associados à proliferação celular) e inactivação dos genes supressores dos tumores. Existem dois tipos de genes supressores dos tumores: genes reparadores do ADN, “caretakers”, e genes inibidores do ciclo celular, “gatekeepers” (Toyokuni, 2006).

As reacções de Fenton afectam preferencialmente locais do genoma mais vulneráveis, como os cromossomas 5 e 8 do rato. A perda do alelo da *p16* parece ser uma etapa chave na carcinogénese induzida pela reacção de Fenton e, por conseguinte, no modelo de cancro induzido pelo stresse oxidativo (Toyokuni, 2006).

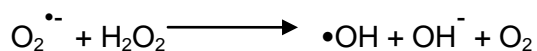
As alterações não genéticas (ou epigenéticas) também são importantes nos processos carcinogénicos induzidos pelo Fe. Os estados redox, como, por exemplo, a exposição de determinados genes ao H_2O_2 , podem estimular a produção de anexina que influencia o ciclo celular com aumento da síntese de ADN e proliferação celular (Toyokuni, 2006).

Cobre

O cobre (Cu) é um elemento químico com número atómico 29 e massa atómica 63,54; é um metal de transição pertencente ao grupo 11 (1B) da Classificação Periódica dos Elementos; existe na crosta terrestre continental na concentração média de 50 ppm (Tab.1.9). Verifica-se, contudo, uma grande variabilidade na sua concentração em função da fonte, podendo atingir valores de 300 ppm nas rochas sedimentares de origem marinha (Mcdowell, 2003). O Cu está mais disponível para absorção pelas plantas que se desenvolvem em solos ácidos, com fraca drenagem, argilosos e com baixo teor em metais antagonistas como o molibdénio (Mo) e o enxofre (S). Pelo contrário, solos ricos em matéria orgânica diminuem a disponibilidade do Cu para as plantas (Mcdowell, 2003).

Em condições de pastoreio existe elevada probabilidade dos ruminantes sofrerem de carência em Cu. Depois da carência em fósforo, a hipocuprose é a segunda carência mineral mais frequente no mundo, tanto sob a forma primária como secundária (Underwood e Suttle 1999a). Esta última resulta de antagonismos ocorridos no rúmen com outros minerais, como o enxofre (S) e o molibdénio (Mo), em condições anaeróbias (Mackenzie, 2005, NRC 2001, Gengelbach e Spears 1998; Black e Frenc 2004, Lebreton et al., 2004). Por conseguinte, níveis elevados de Mo e S na dieta podem ocasionar sintomas de carência secundária em Cu devido à formação de compostos insolúveis de cobre no retículo-rúmen, como os molibdatos e tiomolibdatos cúpricos (Gooneratne et al., 1989; Pinto et al., 1995). Estes compostos não são absorvidos no tubo digestivo e indisponibilizam o Cu veiculado na dieta para absorção. O Cu nos sistemas biológicos apresenta-se na forma de Cu^{2+} ou Cu^+ , constituindo um centro activo nas proteínas ou nas enzimas. Ocasionalmente, pode apresentar-se na forma de Cu^{3+} em pequenos peptídeos (Theophanides e Anastassopoulou, 2006). Cerca de 90% do Cu plasmático dos mamíferos encontra-se ligado à ceruloplasmina (Mcdowell, 2003; Theophanides e Anastassopoulou, 2006). O Cu ligado às proteínas pode reagir com o H_2O_2 para formar radicais hidroxilo ($\bullet OH$), o qual oxida o resíduo do ácido aminado no local de ligação ao metal.

A reacção de Haber-Weiss é o mecanismo proposto pelo qual o Cu participa no stress oxidativo que conduz a várias doenças, incluindo o cancro (Theophanides e Anastassopoulou, 2006):



Sabe-se que o anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é a principal ERO produzida na mitocôndria, sendo precursora do H_2O_2 (Fig. 1.8).

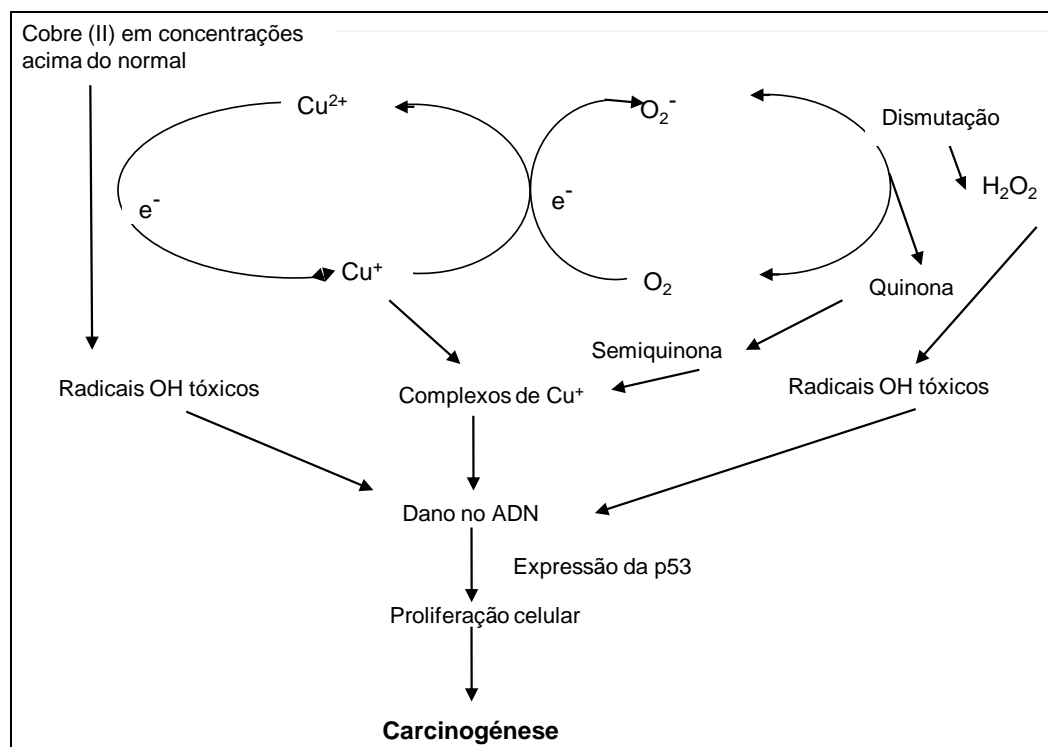
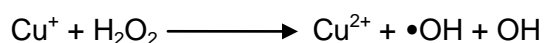


Figura 1.8. Mecanismos de lesão no ADN induzidos por elevadas concentrações de cobre, os quais podem conduzir à formação de cancro. Fonte: adaptado de Theophanides e Anastassopoulou, 2006.

Várias moléculas biologicamente importantes, como os gliceraldeídos, adrenalina e nor-adrenalina, são oxidados na presença de O_2 para produzir aniões superóxido. Foi demonstrado que quantidades mínimas de Fe e de Cu solúvel podem catalizar a transformação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, nas reacções de Fenton:



Selénio

O selénio (Se) é um elemento químico com n.º atómico 34 e massa atómica 78,96; situa-se no grupo dos não-metais (6 A) na Classificação Periódica dos Elementos. Os não-metais são altamente electronegativos, isto é, têm capacidade para ganhar electrões de outros átomos mais facilmente do que libertam os seus (perda), processos designados por redução e oxidação, respectivamente (Hitt, 1988).

Segundo a extensa revisão bibliográfica sobre o papel do Se na prevenção do cancro realizada por Rayman (2005) e por Surai (2006) constatou-se o seguinte:

- a) várias observações epidemiológicas e estudos prospectivos demonstraram a existência de correlação inversa entre níveis de Se no alimento e no sangue e maior risco de cancro e de mortalidade por esta doença em humanos;
- b) estudos do tipo caso-controlo mostraram níveis de Se inferiores no sangue, soro, cabelo e unhas de pacientes com cancro, comparativamente a humanos saudáveis (controles);
- c) várias experiências e análises laboratoriais evidenciaram o efeito protector de várias formas de Se contra a iniciação e desenvolvimento de cancro em modelos animais;
- d) mais de dez ensaios clínicos testaram a eficácia da suplementação com Se na prevenção de vários tipos de cancro em humanos. Os resultados obtidos comprovaram o efeito preventivo do Se contra carcinomas do tracto digestivo, pulmão e próstata em populações residentes em áreas deficientes neste micronutriente.

A suplementação com Se na forma de *L*-selenometionina não revelou diferenças significativas na prevenção do cancro da próstata em populações saudáveis e com níveis séricos normais deste elemento (Lippman et al., 2009).

Os efeitos do Se no organismo são dependentes da sua concentração, variando de essenciais a antioxidantes na faixa nanomolar-micromolar para potenciais pro-oxidantes em níveis superiores ao necessário para a máxima síntese de selenoproteínas. Os compostos de Se podem mesmo revelar efeitos tóxicos por stresse oxidativo e dano nos componentes celulares (Raisbeck, 2000; Vinceti et al., 2001; Papp et al., 2007). Em doses fisiológicas o Se actua como agente anti-mutagénico, previne a transformação maligna das células normais e a activação dos oncogenes (Schrauzer, 2001).

Tabela 1.9 Oligoelementos essenciais: propriedades químicas e distribuição na natureza. Fonte: McDonald et al., 1995; Underwood e Suttle, 1999 a b; McDowell, 2003.

Oligoelementos	Nº atômico	Massa atômica	Grupo químico Valência	Abundância na natureza
• Ferro	26	55,85	8 B; Metal de transição +2 ou +3	Muito abundante 5% (2º metal mais abundante)
• Zinco	30	65,37	11, 2 B; Metal de transição +2	70 a 130 ppm Moderadamente abundante: 24º
• Cobre	29	63,54	11, 1 B; Metal de transição +2 ou +1	50 ppm
• Molibdênio	42	95,94	Vla; Semi-metal ou metalóide +6, +5 e +4	1 ppm
• Selênio	34	78,96	6 A; não-metais -2 a +6	Relativamente escasso 0,09 ppm; 69º
• Iodo	53	126,91	VIIb; Halogéneo	Relativamente raro
• Manganês	25	54,94	VIIa; Metal de transição +2 ou +3	0,10% Relativamente abundante 12º
• Cobalto	27	58,93	VIII; Metal de transição +1	0,001 a 0,002% Escasso

Segundo a extensa revisão bibliográfica realizada por Rayman (2005) foram sugeridos vários mecanismos para explicar os efeitos anti-cancerígenos promovidos pelo Se, entre os quais se destacam: a) redução dos danos no ADN e do stresse oxidativo; b) redução da inflamação que é considerada um promotor do crescimento tumoral; c) destoxificação de carcinogénios e redução na formação de aductos de ADN; d) promoção da resposta imunitária por aumento do número de linfócitos citotóxicos e “killer cells” naturais que destroem as células tumorais; e) aumento na produção de p53, a qual inibe a proliferação celular, estimula a reparação do ADN e promove a apoptose; f) inactivação da proteína cinase C, que é um receptor da sinalização e que desempenha um papel crucial na promoção tumoral pelos oxidantes; g) alteração na

metilação do ADN, a qual está associada com a inactivação dos genes supressores dos tumores; padrões de metilação anormal estão associados a neoplasias; h) bloqueio do ciclo celular, o qual inibe o crescimento e possibilita a reparação do ADN; i) indução da apoptose das células cancerosas, por activação das caspases, família de proteases envolvidas na degradação dos componentes celulares; j) inibição da angiogénese.

1.4.3 Papel dos vírus da papilomatose na génese da hematúria enzoótica

Está provado que alguns tumores do tracto digestivo superior são causados pela transformação maligna induzida pelos vírus da papilomatose bovina (BPV) do tipo 4 (Jarrett, 1987), em actuação concertada com as toxinas do feto comum (Campo et al., 2000). Foi também sugerida uma associação entre os carcinoma da bexiga e os vírus papilomatose bovina do tipo 2 (BPV-2). O feto comum tem sido apontado como uma fonte de co-factores na génese desta doença. Outros co-factores, como a quercetina e outros agentes imunossupressores que existem no feto comum podem contribuir para a progressão tumoral. A relevância do feto comum como co-carcinogénio ambiental para a progressão do papiloma BPV-4 e a presença do BPV-2 na bexiga dos bovinos (Campo et al., 1992), tem sido especialmente investigada na sua relação com a quercetina (Connolly et al., 1998). A importância relativa da quercetina, bem como dos carcinogénios mais recentemente descobertos do feto comum, tanto nos herbívoros domésticos como nos animais de laboratório, permanece desconhecida. Investigações subsequentes têm demonstrado várias associações entre a HEB e a prevalência das proteínas oncogénicas do BPV-2 na população bovina e nos tecidos neoplásicos (Lioi et al., 2004; Sardon et al., 2005; Borzacchiello et al., 2003, 2006, 2009; Roperto et al., 2009).

A importância relativa dos papilomavírus bovinos, as suas relações causais com o Pta, e outras toxinas do feto comum na génese das neoplasias da bexiga permanece por esclarecer cabalmente.

“A virus is a piece of bad news wrapped up in protein”

Sir Peter Medawar, Prémio Nobel da Medicina, 1960

1.5 Etapas da carcinogénese

“Today, chemical carcinogenesis is regarded as a multistep process with a long latency period”, Choudhuri et al., 2007

O cancro é uma doença caracterizada por proliferação descontrolada das células, as quais expressam vários graus de fidelidade para com as suas células de origem. Tanto os factores genotóxicos, que provocam dano directo no ADN, como os não genotóxicos, também designados por epigenéticos (agentes que não reagem com o ADN), são capazes de influenciar o processo carcinogénico e interferir na proliferação e nos processos de morte celular (Goswami e Singh, 2006).

Evidências epidemiológicas e resultados de estudos experimentais (Harris, 1985; London e Vail, 1996; Klaunig e Kamendulis, 2004; Goswami e Singh, 2006; Valko et al., 2006) revelaram que a carcinogénese inclui normalmente três etapas básicas, designadas por: **Iniciação** (1), **Promoção** (2) e **Progressão** (3), conforme ilustrado na Figura 1.9.

1. A **iniciação** consiste numa alteração permanente e irreversível do ADN de uma célula normal após a sua exposição a um carcinogénio. Durante este processo formam-se ligações covalentes, também designadas por aductos, entre o carcinogénio e as bases púricas e/ou pirimídicas do ADN. Para que a alteração seja efectiva é necessário que se verifique mutação, o que implica síntese de ADN e multiplicação da célula. As células iniciadas não se distinguem das outras células do ambiente envolvente. Apesar da iniciação ser um processo irreversível, não implica necessariamente a formação de uma célula cancerosa, pois, podem ser activados os mecanismos reparadores dos danos no ADN, como a activação dos genes supressores dos tumores; durante este estágio pode ocorrer ainda a activação de genes promotores do crescimento tumoral, também designados por oncogenes.
2. Durante o período de **promoção**, verifica-se indução da proliferação celular com expansão clonal das células iniciadas e/ou inibição da apoptose (Fig. 9). Esta etapa é dose-dependente, requer a presença contínua do estímulo de promoção do tumor e é um processo reversível. Ocorre durante longos períodos de tempo e resulta na formação de uma lesão localizada identificável. Os agentes promotores podem induzir alterações na morfologia da célula, índice mitótico e grau de diferenciação; contudo, não alteram o genoma da célula (mecanismos não genotóxicos). Podem ainda ter um efeito inibidor sobre os sistemas de defesa celular antioxidante, tais como a SOD, catalase e

glutatião peroxidase, entre outros. Um nível elevado de stresse oxidativo é citotóxico, refreia a proliferação celular e pode induzir a apoptose ou mesmo provocar necrose celular (Fig. 1.9). Um nível baixo de stresse oxidativo pode estimular a divisão celular, promovendo o crescimento do tumor e a mutagénese. Neste período aumenta a probabilidade de ocorrência de uma segunda alteração genómica (progressão).

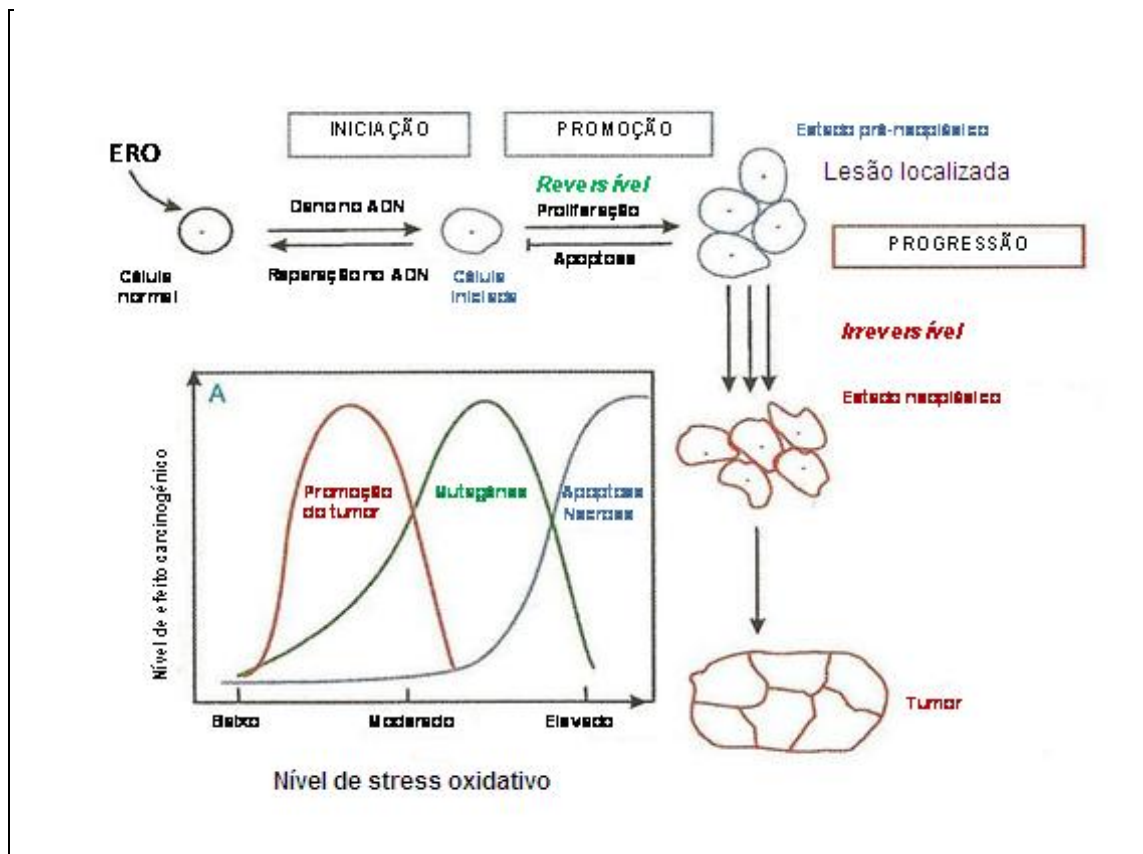


Figura 1.9. Modelo em três estádios da carcinogénese: iniciação, promoção e progressão. No gráfico A apresenta-se o nível do efeito carcinogénico *versus* nível de radicais livres (ERO) nos diferentes estádios da carcinogénese (adaptado de Valko et al., 2006).

3. Na fase de **progressão** as alterações genéticas são irreversíveis; regista-se grande instabilidade genética devida a mutações nos oncogenes e nos genes supressores dos tumores; pode ocorrer alteração do número de cromossomas (aneuploidia) e perda da sua integridade funcional; é nesta etapa que se verifica malignização celular com aparecimento de alterações fenotípicas importantes: conversão de células tumorais benignas em malignas (Kusewitt e Rush, 2007); os agentes progressores podem afectar a taxa de crescimento,

invasibilidade e capacidade de metastização das células tumorais por estimulação da angiogénese.

As ERO podem actuar em todas as fases da carcinogénese, acelerando cada uma das três etapas (Droge, 2002; Klaunig e Kamendulis, 2004; Hughes e Kitchin, 2006).

O período de latência entre a iniciação e a progressão tumoral pode ser superior a 20 anos nos humanos (Harris, 1985). A duração deste período depende da interacção entre os factores promotores de cada uma das fases da carcinogénese e dos factores inibidores ou protectores.

1.6 Mecanismos de sinalização celular, apoptose e morte celular

As células comunicam entre si e respondem a estímulos extracelulares através de mecanismos biológicos designados por **sinalização celular**. Este processo possibilita a transmissão da informação do exterior da célula para vários elementos funcionais dentro da célula. Os factores extracelulares que despoletam a sinalização são hormonas, factores de crescimento, citocinas e neurotransmissores. Os sinais enviados para a maquinaria celular de transmissão responsável pela expressão de certos genes são remetidos para o núcleo da célula através de proteínas designadas por factores de transcrição. Estes, por ligação a sequências de ADN específicas, regulam a actividade da ARN polimerase II. Este processo de sinalização celular pode induzir várias actividades biológicas como a contracção muscular, expressão genética, crescimento celular e transmissão nervosa.

Embora as ERO estejam predominantemente implicadas em processos de agressão ou dano celular também desempenham um papel fisiológico importante em vários aspectos da sinalização e da regulação intracelular (Thannickal e Fanburg, 2000; Valko et al., 2006), interferindo na expressão de genes e nas vias sinalizadoras (Fig. 1.10). Dado que as ERO são oxidantes por natureza, influenciam o estado redox e podem, em função da sua concentração, provocar uma resposta positiva, induzindo a proliferação celular, ou uma resposta negativa, promovendo a paragem do crescimento ou mesmo a morte celular.

As ERO, em baixas concentrações, actuam como mensageiros secundários na regulação do Ca (II) citosólico, na fosforilação proteica e na activação de certos factores de transcrição nuclear como o NF- κ B e AP-1.

As ERO e os iões metálicos inibem principalmente as fosfatases (lipídicas, fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina) por interacção com grupos sulfidriolo nos resíduos de

cisteína, os quais são oxidados para formar ligações dissulfeto intra ou inter moleculares. Estas alterações estruturais alteram a conformação das proteínas e despoletam várias cascatas sinalizadoras: cinase do factor de crescimento, cinases da família Abl (Moresco, 2006), *Mitogenic-Activated Protein Kinases* (MAPK) e cinase PI-3. Estas cascatas sinalizadoras conduzem à activação de vários factores de transcrição regulados por mecanismos redox (AP-1, NF- κ B, p53, HIF-1, NFAT), como se pode visualizar na Fig. 1.10.

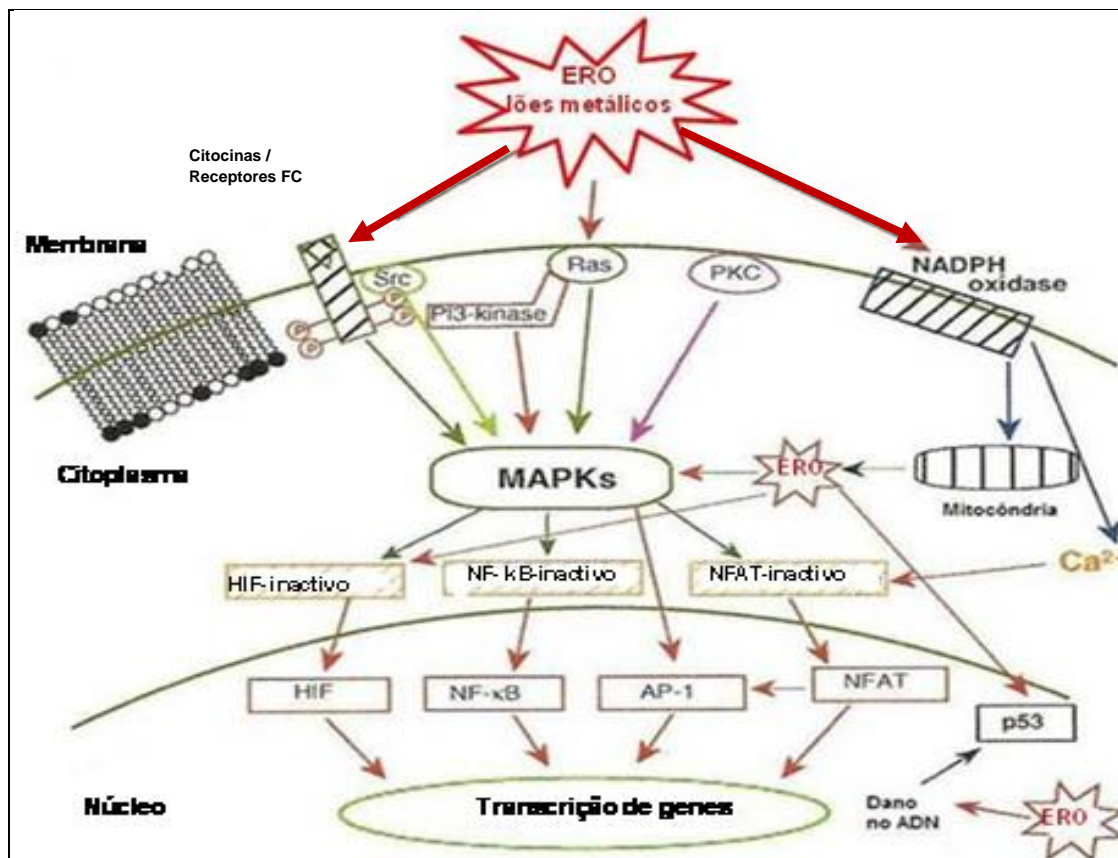


Figura 1.10. Vias de sinalização celular induzidas pelas espécies reativas de oxigénio (ERO) e pelos iões metálicos; receptores FC = receptores dos factores de crescimento; PKC = proteínocinasas C; MAPKs = *Mitogenic-Activated Protein Kinases*; NFAT = *Nucleated Factor of Activated T cells*; HIF-1 = *Hypoxia-inducible factor 1*; AP-1 = *Activator Protein 1* (Adaptado de Valko et al., 2006).

Pode ocorrer produção de ERO como consequência da activação dos receptores de crescimento: factor de crescimento epidérmico, *epidermal growth factor* (EGF), factor de crescimento derivado das plaquetas, *platelet-derived growth factor* (PDGF), e factor de crescimento vascular endotelial, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e outros, como os receptores de citocinas, factor de necrose tumoral, (TNF- α e IFN- γ) e de interleucinas (IL-1 β). Aceita-se que as ERO formadas por estes mecanismos possam actuar como verdadeiros mensageiros secundários e mediar importantes funções

celulares, como a proliferação e a morte celular programada (Valko et al., 2006). Anomalias no funcionamento dos receptores do factor de crescimento estão estreitamente associadas ao desenvolvimento de vários cancros (Zwick et al., 2001; Bach et al., 2004). Os metais carcinogénicos, como o níquel (Ni), o arsénio (As), o cobalto (Co) e o berílio (Be), interferem com o funcionamento dos receptores do factor de crescimento; foi observada expressão excessiva do receptor do EGF nos cancros do pulmão e do tracto urinário (Simeonova e Luster, 2002).

A Src é uma cinase proteína-tirosina não associada a receptor; localiza-se na camada interna da membrana celular (Fig. 1.10) e funciona fosforilando alvos internos em resposta a estímulos externos promotores do crescimento (Heidmann, 2007); a designação de Src deve-se à sua capacidade de induzir a formação de sarcomas em frangos. Há cerca de 100 anos Peyton Rous demonstrou que um extracto de um tumor de frango pode induzir a formação de tumores noutros frangos, passando a ser conhecido por sarcoma de Rous e foi o primeiro oncogene a ser descoberto (Mayer, 1997). Actualmente a Src constitui uma família de cinases proteicas que são proto-oncogenes com importantes funções na morfologia, motilidade, proliferação e sobrevivência celular (Roskoski, 2004). A Src é activada pelo As (III), Cr (III) orgânico, radiação UV, bem como várias ERO e constitui um pré-requisito para a activação do receptor do EGF e da ERK (Simeonova e Luster, 2002; Simeonova et al., 2002). Tem sido observada expressão excessiva da Src nos cancros do cólon, mama, pâncreas, bexiga e cabeça/pescoço de humanos (Valko et al., 2006). A Src activada inicia as vias de sinalização do MAPK, NF- κ B e PI3K (Fig. 1.10).

De forma similar, o gene Ras é activado pela radiação UV, ERO, metais (As, Ni, Fe e Be) e estímulos mitogénicos. Constatou-se que os genes Ras estão mutados em 30% dos cancros do pulmão, pele, fígado, bexiga e cólon (Vachtenheim, citado em Valko et al., 2006).

Os alvos directos das ERO melhor caracterizados são as *protein tyrosine phosphatases* (PTPs). A inactivação das PTPs de forma reversível pelas ERO desempenha um papel importante no controlo redox e na sinalização celular. A inibição das PTPs pelas ERO pode despoletar directamente a acção das fosfotirosinocinases (Fig. 1.10).

O Ca (II) tem sido reconhecido como um factor de sinalização envolvido na regulação de uma ampla variedade de processos biológicos, tais como a proliferação e a diferenciação celulares e a apoptose. Experiências realizadas têm revelado que as

ERO libertam o Ca (II) das reservas intracelulares, resultando em activação das cinases, tais como as proteino-cinases C (PKC). As PKCs fazem parte do grupo das cinases serina/treonina. As ERO e os metais podem activar directamente alguns processos de fosforilação da serina/treonina. A PKC contém várias zonas ricas em cisteína, tanto no “*zinc finger*” do domínio regulador como no local catalítico, os quais podem ser modificados por vários oxidantes (Gopalakrishna e Jaken, 2000). Tanto os domínios reguladores como os catalíticos da PKC são susceptíveis à modificação oxidativa induzida pelo peróxido de hidrogénio (Valko et al., 2006). A activação da PKC induzida por antioxidantes tem um papel crucial na proliferação do cancro e na regulação das vias sinalizadoras, como, por exemplo, activação das MAPKs (Fig. 1.10), factores de transcrição e proto-oncogenes (Dempsey et al., 2000).

As MAPKs são um grupo de proteínas que recebem e transmitem informação gerada por estímulos exógenos e endógenos para o espaço intracelular, via fosforilação das proteínas. Durante este processo, as MAPKs interagem com os mediadores provenientes da membrana celular, envolvendo receptores do factor de crescimento, proteínas G e cinases da tirosina, e despoletam os mediadores de transcrição nuclear (Fig. 1.10). Vários estudos comprovaram que as cinases serina/treonina da família das MAPKs são reguladas por oxidantes (Lopez-Illasaca et al., 1997). Estas enzimas são importantes no processo carcinogénico, incluindo a proliferação e a diferenciação celulares e a apoptose. Os metais carcinogénicos, como o arsénio, o crómio e o berílio, têm mostrado activar as MAPK (Leonard et al., 2004).

O efeito mais significativo dos metais e das ERO nas vias de sinalização tem sido notado nas vias relacionadas com as MAPKs (Valko et al., 2006). Isto envolve a activação dos factores de transcrição nuclear. Estes factores controlam a expressão de genes protectores que reparam o ADN alterado, fortalecem o sistema imunitário, param a proliferação das células danificadas e induzem a apoptose. O factor de transcrição nuclear NF- κ B está envolvido na resposta inflamatória e o AP-1 é importante para o crescimento e diferenciação celular. O factor nuclear das células T activadas (NFAT) regula a formação de citocinas, o crescimento e a diferenciação muscular, a angiogénese e a adipogénese. O HIF-1 regula a actividade de muitos genes relacionados com o cancro, incluindo o VEGF, enolase, heme oxigenase 1 e lactato desidrogenase A (Valko et al., 2006).

A proteína p53 (proteína com 53-kilodalton de massa molecular) protege o ciclo celular e a sua inactivação permite a divisão celular descontrolada (Heidemann, 2007). A p53

é um factor nuclear que desempenha um papel chave na protecção da célula da tumorigénese (Hollstein et al., 1991). Devido à sua capacidade para parar o ciclo celular e iniciar a apoptose se ocorre dano na célula, é designada por “supressor tumoral”. A p53 é activada pela radiação UV, hipoxia, γ -radiação, privação de nucleótidos e outros. Estima-se que mais de 50% dos cancros observados nos humanos apresentem alteração do gene da p53 (Sun e Oberley, 1996; Heidemann, 2007).

As ERO têm sido correlacionadas com a apoptose mediada pela p53 (Vousden e Ryan, 2009). A expressão excessiva da p53 faz aumentar os níveis de ERO e a inibição destas pelos antioxidantes inibe a apoptose (Polyak et al., 1997). A família da p53 regula, pelo menos, duas proteínas que participam na apoptose mediada pelas ERO: ferredoxina reductase (FDR) e REDD1/HIF-1. Para além da formação de ERO, a p53 induz a expressão da p85, a qual pode funcionar como molécula de sinalização durante a apoptose dependente da p53 e mediada pelas ERO. A p85 é um regulador da fosfatidil-inositol-3 cinase (PI3K) - ver Figura 1.10.

O efeito dos antioxidantes na p53 é ambíguo (Kim et al., 2002; Vousden e Ryan, 2009). Enquanto que a SOD, que converte o $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , aumenta a actividade da p53, a catalase, que remove o H_2O_2 , reduz a actividade da p53 (Valko et al., 2006). O aumento da formação de $\bullet OH$ promove a activação da p53 nas células A549, através da redução do Cr (IV) pela NAD(P)H, seguida pelo Cr(V) que cataliza a decomposição do H_2O_2 (Wang e Shi, 2001).

O tratamento com Cr(VI) induz a apoptose mediada pela p53 de forma indirecta e por vias múltiplas: por dano no ADN, via ligação do ADN aos produtos de reacção do Cr (VI), por activação directa da p53 e por promoção do efeito de outros carcinogénios. Outro mecanismo pelo qual os metais afectam a p53 é através da substituição do Zn, o qual é imprescindível para a ligação da p53 ao ADN. Os metais que substituem o Zn podem inactivar a p53 sem mutação ou oxidação (Wang e Shi, 2001).

Vários estudos evidenciaram mutações na p53 após a sua exposição ao $NO\bullet$. Assim, a exposição celular a níveis elevados de $NO\bullet$ e seus derivados, como ocorre na inflamação crónica, na ausência da p53 normal, pode aumentar a susceptibilidade ao cancro. O $NO\bullet$ e os seus derivados são capazes de provocar mutações nos genes

relacionados com o cancro e actuarem como iniciadores e promotores da carcinogénese (Souici et al., 2000).

A família NFAT dos factores de transcrição nuclear regulam o crescimento e a diferenciação muscular, formação de citocinas, angiogénese e outros processos (Rao et al., 1997). Quatro das cinco proteínas NFAT são cálcio dependentes. A NFAT é activada através de níveis elevados de cálcio intracelular por mediação pela fosfatase calcineurina. São conhecidos vários metais, como o vanádio, níquel e ferro, que fazem aumentar o cálcio intracelular, sendo este um mecanismo indirecto pelo qual os metais activam a NFAT (Leonard et al., 2004).

A HIF-1 é induzida pela expressão de oncogenes tais como o Src e o Ras (Fig. 1.10) e está sobre-expressa em muitos cancros (Zhong et al., 1999). A VEGF é uma das proteínas reguladas pela HIF-1 e desempenha um papel importante na progressão tumoral e na angiogénese. A principal ERO responsável pela indução do HIF-1 e expressão do VEGF é o H_2O_2 (Gao et al., 2002). Vários metais carcinogénicos activam a HIF-1. As células tratadas com níquel apresentam concentrações aumentadas de HIF-1; este factor de transcrição é muito sensível à hipoxia e à regulação precisa da homeostasia do oxigénio. Uma das explicações mais plausíveis para a activação do HIF-1 pelo níquel é baseada no pressuposto que o Ni substitui o Fe como transportador de O_2 na molécula de hemoglobina (Leonard et al., 2004). A substituição do Fe pelo Ni despoleta o sinal de hipoxia permanente, o qual desencadeia a activação do HIF-1. Foi, ainda, demonstrado que o vanádio também induz a expressão do HIF-1 nas células DU145 (Hwang et al., 2004).

2. Estudo Epidemiológico

2.1. Introdução

Com base na literatura científica disponível sobre ocorrências relacionadas com a HEB, e na constatação da existência de um problema de infestação das pastagens micaelenses pelo feto comum, foi avançada a hipótese da existência de associação entre a incidência de tumores de bexiga em bovinos e a ingestão daquela planta.

Foi assim proposto, implementado e desenvolvido um estudo que visou a caracterização epidemiológica da ocorrência de tumores da bexiga dos bovinos da ISM e aprofundar e clarificar os objectivos seguintes:

- a) Determinação da associação entre a ingestão do feto comum e a hematúria enzoótica nos bovinos da ISM;
- b) Monitorização da incidência de tumores de bexiga nos bovinos abatidos no Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel (MISM) desde Julho de 1989 até Dezembro de 2009;
- c) Determinação das áreas e explorações de maior incidência de HEB;
- d) Acompanhamento de explorações com problemas de intoxicação aguda ou crónica pelo feto comum e identificação de práticas de manejo consideradas de risco para a doença;
- e) Determinação dos valores de ptaquilósido no feto comum das explorações com problemas de intoxicação.

Tendo em vista a identificação de todos os bovinos portadores de tumores malignos e a sua eliminação da cadeia alimentar, conforme o disposto no Regulamento de Inspecção Sanitária (Decreto-Lei 348/85 de 23 de Agosto), foram implementadas no MISM, a partir de Outubro de 1996 até ao presente, medidas de inspecção sanitária reforçada de forma a diagnosticar todos os bovinos abatidos portadores de neoplasia vesical. Considerando que os bovinos portadores de HEB apresentam períodos assintomáticos, isto é sem exibirem hematúria, tornou-se imperioso para a detecção de todos os portadores da doença, a adopção de medidas de rastreio eficaz durante a inspecção sanitária no matadouro, procedendo-se à abertura e observação sistemática da bexiga de todas as carcaças com observação da mucosa. Este procedimento faz actualmente parte das normas do bom funcionamento da inspecção sanitária do MISM, iniciando-se desta forma um processo de *epidemiovigilância activa* da HEB na ISM (Gráfico 1.2). Com a implementação desta metodologia foi possível acompanhar a

evolução da HEB desde 1995 até à actualidade.

2.1.1. Caracterização do sistema produtivo

Cerca de 39 908 ha (85%) do total da área utilizável para fins agrícolas, na ISM, é utilizada para pastagens permanentes. As espécies vegetais dominantes nos prados são o azevém (*Lolium perenne* L.) e o trevo (*Trifolium repens* L.). A área de pastagem relativa a cada exploração está normalmente distribuída por numerosas pequenas parcelas, agrupadas em blocos de pastoreio, sem contiguidade. Este facto obriga a múltiplas e frequentes deslocações dos animais entre parcelas e blocos de pastoreio, processo conhecido por transumância. Os animais pastam quase sempre em rotação progressiva ou por talhões, com auxílio de vedações eléctricas móveis, ou em círculo, amarrados a uma estaca por uma corrente metálica na canela de um dos membros anteriores. Em algumas vitelas ou novilhas a corrente pode ser presa no terço superior do pescoço. A excepção a esta prática de manejo, são as vitelas de substituição que, presas a estacas junto da casa do proprietário, são alimentadas à mão com leite do tanque de ordenha e suplementadas com concentrados comerciais. Apenas ao desmame são introduzidas nos grupos que compõem a manada e, com frequência, levadas para as pastagens de qualidade inferior, situadas em encostas com relevo irregular e a altitudes mais elevadas.

As melhores pastagens ficam reservadas para as vacas em produção que recebem suplementação alimentar através de concentrados comerciais administrados durante a ordenha. Em regra, as novilhas de substituição não recebem nenhuma suplementação para além do alimento disponível no pastoreio, que se prolonga geralmente até ao primeiro parto. Algumas semanas antes da data prevista para o parto, as novilhas são integradas no grupo das vacas leiteiras.

A maioria das pastagens da ISM permitem pastoreio permanente ao longo de todo o ano, com excepção do Inverno a altitudes superiores a 600 metros e no Verão a baixa altitude (<200m). No Inverno a produção forrageira é limitada nas pastagens localizadas nas áreas de maior altitude, devido às baixas temperaturas e a pluviosidade elevada. Pelo contrário, nos meses de Verão, especialmente em Julho e Agosto, as elevadas temperaturas e a baixa pluviosidade, típicas das áreas localizadas a baixa altitude, são factores limitativos do crescimento forrageiro. Nas épocas de maior escassez de erva, é prática corrente por parte dos produtores suplementarem os bovinos com silagem de erva e de milho, feno e alimentos compostos complementares.

2.2 Material e métodos

O estudo epidemiológico iniciou-se com a compilação dos dados relativos às causas de rejeição de carcaças de bovino no então designado Matadouro Frigorífico e Industrial de Ponta Delgada (Pinto et al., 1996a). Hoje, com a construção de uma nova unidade industrial de abate para toda a Ilha, passou-se a denominar-se Matadouro Industrial de São Miguel (MISM). Este trabalho baseou-se na análise retrospectiva da ocorrência de tumores da bexiga (Tbx) nos bovinos leiteiros da ISM, a partir da consulta dos registos de inspecção sanitária efectuados pelos médicos veterinários de serviço neste matadouro. Foram compilados os dados retrospectivos relativos às rejeições por neoplasias nos bovinos desde o segundo semestre de 1989 até Dezembro de 1994 (Pinto et al., 1996a). Este período de tempo foi considerado de *vigilância passiva* da HEB, porque apenas se abriam e observavam as bexigas dos bovinos que exibiam hematúria no exame *ante-mortem* no matadouro.

Tendo em vista a identificação das áreas e explorações mais atingidas pela HEB na ilha de São Miguel foram distribuídos geograficamente os casos identificados de Tbx no MISM.

Analisaram-se ainda as variações ocorridas no efectivo de vacas leiteiras e das explorações respectivas que se candidataram ao prémio de manutenção de vacas leiteiras previsto no programa de ajudas comunitárias a favor das regiões ultraperiféricas da União Europeia, designado por *POSEIMA* (Portaria nº 26/2007 de 26 de Abril) nos últimos 15 anos (Jan/95 a Dez/09).

Os dados obtidos foram correlacionados com dados relativos à orografia e densidade populacional bovina na ISM.

A informação obtida foi considerada fundamental para a implementação criteriosa de medidas preventivas da HEB ao nível das explorações mais atingidas pelo problema. Foram visitadas as explorações com maior número de casos registados de HEB e acompanhadas as ocorrências clínicas susceptíveis de se relacionar com casos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF).

Os surtos de IAF observados registaram-se na sua maioria nas áreas mais afectadas pela HEB na ISM. Dado existir uma relação temporal próxima (cerca de 3 semanas) entre a ingestão do feto comum e o aparecimento dos sintomas de IAF, foram caracterizados estes surtos no sentido de identificar práticas de manejo dos bovinos e das pastagens consideradas de risco para a HEB. Deste modo foi possível sensibilizar os produtores, de uma forma mais objectiva, para os problemas provocadas pelas toxinas do feto comum, tendo em vista a sua correcção e prevenção futura.

2.2.1. Constituição da base de dados

A informação obtida sobre a ocorrência de Tbx provenientes do matadouro foi complementada com a informação contida em bases de dados do Serviço de Desenvolvimento Agrário de São Miguel (SDASM), nomeadamente os cadastros das explorações bovina e dos efectivos animais: SIARA e SIBOV, respectivamente. Recorreu-se ainda aos dados do POSEIMA vacas leiteiras e mais recentemente ao Sistema Nacional de Rastreio e Identificação de Bovinos (SNIRB), hoje designado por Sistema Nacional de Identificação Animal (SNIRA), conforme Decreto-Lei nº 142/2006 de 27 de Julho.

2.2.2. Caracterização do efectivo bovino e dos sistemas produtivos

Foram caracterizados os sistemas de produção na ISM e a distribuição da população de bovinos com o objectivo de se realizar o delineamento experimental do estudo epidemiológico do tipo *caso-controlo*. Para tal, recorreu-se aos anuários e às bases de dados oficiais, já mencionadas - SIARA e SIBOV – organizadas e geridas pelo SDASM.

2.2.3. Delineamento do estudo epidemiológico analítico tipo caso-controlo

O estudo epidemiológico *caso-controlo* considerou como unidade epidemiológica a exploração de bovinos leiteiros. Os “casos” foram definidos como explorações com HEB confirmada pelo clínico veterinário assistente e/ou com historial de Tbx visualizados no exame *post-mortem*, no matadouro pelos inspectores sanitários de serviço no MISM. Como “controles” foram consideradas as explorações de bovinos leiteiros sem qualquer registo de casos de HEB ou de Tbx na altura do delineamento experimental do presente estudo. Foram seleccionadas intencionalmente 50 explorações-caso e 20 explorações-controlo, tendo em vista o estudo de uma amostra representativa das explorações de bovinos da ISM. Esta selecção teve em conta alguns critérios como: (i) localização geográfica da exploração, tendo sido dada preferência a explorações de áreas da ISM mais atingidas pela HEB; (ii) existência de dados clínicos e/ou registos de matadouro acerca das explorações em estudo; (iii) disponibilidade dos produtores para responderem ao questionário epidemiológico. As 20 explorações-controlo seleccionadas foram aquelas localizadas, sempre que possível, nas proximidades das explorações-caso, obedecendo também aos critérios anteriormente definidos, excepto para o ponto (ii), isto é, sem registo de qualquer ocorrência de HEB ou de Tbx no momento da realização do inquérito epidemiológico.

2.2.4. Recolha de dados

Cada exploração foi visitada pelo menos uma vez durante cerca de um dia, para recolha de dados através de entrevista pessoal e de observação directa das pastagens e das condições de manejo dos bovinos. O questionário utilizado (ver anexo 1) procurava caracterizar o sistema de produção (a exploração, o efectivo animal, encabeçamento e a produtividade), as práticas de manejo animal e de alimentação do efectivo, o grau de infestação das pastagens pelo feto, as eventuais medidas de prevenção da HEB e a avaliação do consumo da planta infestante pelos bovinos. As parcelas de pastagem observadas dos diferentes blocos de pastoreio foram descritas individualmente.

As pastagens foram classificadas, quanto ao tipo de utilização da terra, em duas classes: (i) “*pastagem renovada*” as pastagens em que havia alguma alternância de utilização agrícola, como por exemplo cultura de milho forrageiro e beterraba sacarina e, (ii) por “*pastagem permanente*” as pastagens que não sofrem qualquer rotatividade vegetal.

O consumo do feto comum pelos bovinos foi avaliado pelos sinais físicos, assinalando o corte feito na planta pelos animais durante o pastoreio. Este processo de corte do feto pelos bovinos foi designado por *herbivoria*, seguindo a denominação anglo-saxónica para estas situações: “*herbivory*” (Smith BL, 1999, comunicação pessoal). Verificou-se que normalmente apenas as partes tenras da planta, como os rebentos e as porções imaturas das frondes eram consumidas pelos bovinos durante o pastoreio.

A homogeneidade dos grupos de animais partilhando a mesma pastagem foi avaliada por observação do tamanho, idade e uniformidade da constituição dos grupos. Foram considerados grupos heterogéneos os grupos que apresentavam animais de tamanhos e idades diferentes.

Dados sobre a produção de leite, sobre a área agrícola disponível e sobre o número de parcelas de pastagem utilizadas foram obtidos a partir das informações fornecidas pelas empresas de lacticínios receptoras do leite produzido e das bases de dados SIARA e SIBOV.

2.2.5. Gestão e análise de dados

Os dados do estudo foram processados e agregados numa base de dados relacional desenvolvida em *Microsoft Access 97*. Foi realizada uma análise descritiva das variáveis, calculando as medidas de tendência central e de dispersão das variáveis quantitativas e a distribuição e frequências para as variáveis qualitativas. Foi realizado o teste do Qui-quadrado para estudar se as diferenças entre a ocorrência das

variáveis nas explorações caso e nas explorações controlo eram significativas. Foram calculados os *odds ratio* (OR), como medida de risco, uma vez que não se tratando de um estudo prospectivo não é possível utilizar o risco relativo. Para a análise estatística foram usados os programas *Microsoft Excel 97* e *Epi-Info 6.0*.

2.2.6. Agrupamento dos bovinos abatidos e rejeitados por tumores de bexiga nas diferentes faixas etárias

Foram compilados os dados relativos ao número total de bovinos abatidos por categoria (faixa etária) nos últimos sete anos no MISM, bem como as rejeições de carcaças por Tbx registadas pelos inspectores sanitários de serviço naquela unidade de abate, desde Janeiro de 2000 até Dezembro de 2009.

2.2.7. Estudo comparativo da incidência de tumores de bexiga nas vacas importadas abatidas

A informação obtida nos itens anteriores foi comparada com os dados obtidos da inspecção sanitária da população de vacas importadas e abatidas no MISM. Esta população de bovinos não esteve exposta durante os primeiros dois anos de vida aos factores de risco identificados na ISM para a HEB. Estes animais foram importados para a ISM com cerca de 2 anos de idade, de países como a Holanda, França e Alemanha. Na Holanda não há registos de casos de HEB (Dawra e Sharma, 2001), na França e na Alemanha existem apenas pequenos focos de HEB localizados em áreas montanhosas (Bringuier e Jean-Blain, 1987).

2.2.8. Identificação das freguesias e das explorações de bovinos leiteiros mais atingidas pela hematória enzoótica

Foram compilados os dados relativos ao número de vacas leiteiras e explorações candidatas ao *POSEIMA* desde 1995 a 2007 na ISM, bem como os dados obtidos da Inspeção Sanitária no MISM relativos às rejeições por Tbx. Considerou-se como exploração afectada pela HEB toda aquela que remeteu para abate pelo menos uma vaca com diagnóstico de Tbx no exame *post-mortem* no MISM. Com base na marca auricular do bovino abatido e rejeitado por Tbx, foram consultadas as bases de dados do SNIRB e SNIRA, bem como o *POSEIMA vacas leiteiras*, onde constam todos os produtores de bovinos leiteiros que se candidataram ao prémio de manutenção destes animais. Estes produtores foram agrupados por ordem alfabética e distribuídos por freguesia, tendo como base a localização geográfica da exploração. A informação obtida possibilitou a criação de uma base de dados, em formato *Excel*® 2003, que permitiu a distribuição anual dos Tbx pelas explorações e pelas freguesias da ISM. Este procedimento conduziu à identificação das explorações de bovinos leiteiros e

das freguesias mais atingidas pela HEB, bem como a sua monitorização ao longo dos últimos 15 anos (Jan/95–Dez/09). A distribuição geográfica dos Tbx por freguesia foi realizada com recurso ao programa *Arch Info*®.

A distribuição anual das vacas diagnosticadas com Tbx no MISM pelas várias explorações existentes nas 59 freguesias da ISM permitiu agrupá-las segundo um gradiente de intensidade, em 8 categorias diferentes segundo uma escala de cores, tendo como base a percentagem de explorações afectadas por Tbx em cada uma das freguesias (Fig. 2.4). As freguesias sem qualquer registo de Tbx foram representadas pela cor branca. Aquelas pouco afectadas (<10%) foram assinaladas no mapa com tons de rosa claro, as freguesias com mais de 60% das explorações atingidas pela HEB foram representadas por vermelho escuro acastanhado. As restantes foram agrupadas segundo um gradiente de intensidade de coloração vermelha. A informação obtida foi comparada com dados relativos à orografia e densidade populacional bovina da ISM.

2.2.9. Determinação dos níveis de ptaquilósido

Foram colhidas 50 amostras de feto comum nas pastagens onde ocorreram surtos de IAF e naquelas das explorações com maior número de casos clínicos de HEB, para determinação dos valores de ptaquilósido (Pta). O critério da amostragem foi baseado na simulação do corte feito pelos bovinos na planta, sendo colhidas apenas as partes mais tenras e imaturas das frondes e rebentos do feto comum.

As amostras devidamente identificadas foram desidratadas em estufa a 55°C durante 48 horas e depois de moídas foram congeladas a -20°C, até serem remetidas para análise. As primeiras 35 amostras foram remetidas para o Laboratório de Química do Departamento de Ciências Agrárias (DCA) da Universidade dos Açores e as restantes para o Laboratório do Departamento de Química do “*Royal Veterinary and Agricultural University*” da Dinamarca.

A determinação do Pta foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão segundo o método preconizado por Agnew e Lauren, 1991 (Ver Anexo 2).

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterização do efectivo

Segundo os dados do “POSEIMA vacas leiteiras” de 1997, existiam na ISM 2 101 explorações de bovinos leiteiros, às quais corresponde um efectivo total de 50 108 vacas leiteiras. A informação obtida no Recenseamento Geral da Agricultura (RGA, 1999), permitiu concluir que os dados acima mencionados estariam subestimados, tendo-se constatado, segundo estes censos, que existiam na ISM cerca de 55 000 vacas leiteiras. Foram recenseadas 2 026 explorações de bovinos leiteiros com uma média de 26,4 vacas por exploração e uma área média de 19,7 ha de superfície forrageira disponível. A raça Holstein-Friesian é a dominante nesta ilha.

A distribuição geográfica do efectivo de vacas leiteiras na ISM é variável e está representada na Figura 2.1.

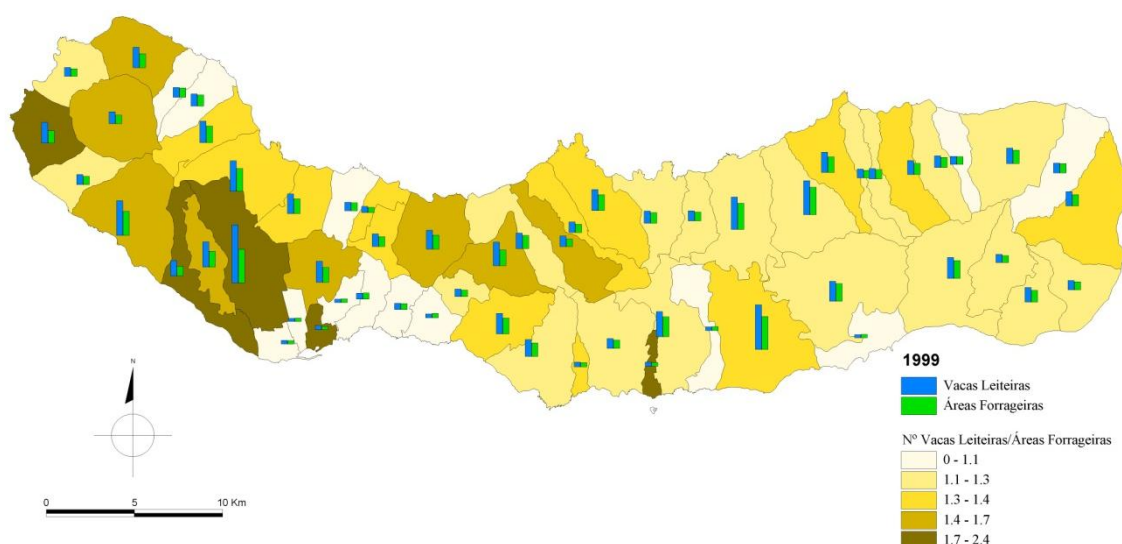


Figura 2.1. Densidade de vacas leiteiras na Ilha de São Miguel.

Fonte: *Recenseamento Geral da Agricultura 1999. Instituto Nacional de Estatística e Serviço Regional de Estatística dos Açores.*

2.3.2 Estudo caso-controlo

Com os meios humanos disponíveis foram visitadas, durante um período de 15 meses, as 70 explorações seleccionadas para o estudo epidemiológico e realizados os inquéritos respectivos.

A área de pastagem utilizada nas explorações estudadas distribuía-se, em média, por 16,6 parcelas, nem sempre contíguas. O universo de folhas ou parcelas de pastagem observadas foi de 365 unidades. Foram visitadas, em média, 5,2 parcelas de pastagem por exploração. Aquelas parcelas representavam mais de 75% da área disponível de pastagem para cerca de metade das explorações amostradas. A área média das pastagens na amostra estudada era de 28,3 ha, variando entre 4,6 ha e

151,4 ha.

Verificou-se que a quase totalidade dos produtores visitados faziam silagem de milho e de erva. Em 74% das explorações estudadas também era produzido feno. As parcelas utilizadas para este tipo de produção forrageira localizavam-se, predominantemente, nas zonas de baixa altitude. Ainda assim, 99% das vacas em produção eram suplementadas com concentrados, tal como 80% das vitelas. Esta proporção caía para 26% nas novilhas de reposição. A administração de suplementos vitamínicos e minerais, foi também maior para as vacas leiteiras em produção, sendo 53% os produtores que praticavam esta suplementação. As vitelas e as novilhas até ao 1 ano de idade apenas eram suplementadas em 11% das explorações. Cerca de 21% dos produtores inquiridos suplementavam as novilhas da faixa etária compreendida entre o ano de idade e o parto.

As explorações amostradas localizavam-se em 30 das 59 freguesias da ISM (Fig. 2.2).

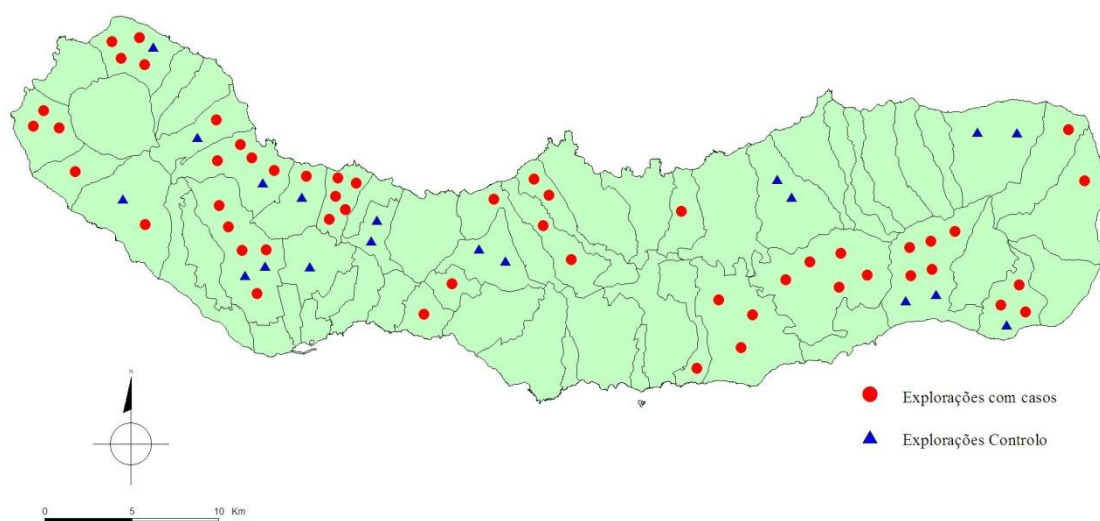


Figura 2.2. Distribuição geográfica na ilha de São Miguel das 70 explorações estudadas (50 explorações-caso e 20 explorações-controlo).

A dimensão média dos efectivos da amostra estudada era de 96 animais, dos quais, em média, 45 eram vacas leiteiras, produzindo 5 025,3 litros de leite/vaca/ano. Este valor era próximo da média obtida do conjunto das explorações da ISM.

Cerca de 86% das vacas eram ordenhadas na pastagem, utilizando unidades móveis de ordenha mecânica. Apenas em 2,9% das explorações amostradas ainda era usada a ordenha manual. Actualmente assiste-se a uma maior tendência para fixação das ordenhas numa só parcela de pastagem com a implementação crescente de unidades

de ordenha fixas. Esta mudança dá maior garantia higiénica e melhora os parâmetros de qualidade do leite, com reflexos positivos no seu preço de venda e consequente melhoria da rentabilidade para o produtor.

Em média, as novilhas apresentavam um peso médio <500 kg, com mais de 24 meses de idade ao primeiro parto. A idade média ao primeiro parto situava-se na maioria dos casos entre os 28 e os 30 meses.

A infestação por *Pteridium aquilinum* foi detectada em 312 das 365 parcelas observadas (88,4%), e quase sempre junto às barreiras separadoras das pastagens (Fig. 2.3).



Figura 2.3. Pastagem de exploração controlo (A); pastagem de exploração com problemas de HEB, são notórios os sinais de herbivoria para o feto comum (B).

Em apenas um caso foi verificado existir feto comum na pastagem, mas não nas barreiras. A infestante foi observada em 90% das pastagens situadas a baixa altitude (menos de 400m) e em apenas 72% das pastagens de altitude. As pastagens a baixa altitude tinham 3,7 vezes maior probabilidade de estarem infestadas pelo feto comum do que as pastagens de altitude (Tabela 2.1). Cerca de 92% das parcelas com pastagens permanentes apresentavam infestação pelo feto comum. Esta proporção era de 78% nas parcelas com pastagens renovadas. Verificou-se que esta diferença era estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Tab. 2.1), parecendo que a renovação das pastagens tem um impacto positivo no controlo do feto infestante, sendo contudo necessário ter em consideração que esta prática não elimina os fetos existentes nas barreiras e sebes divisórias.

Comparando a altitude das parcelas com pastos permanentes, a diferença manteve-se significativa, representando um risco ainda maior (OR=7,97) a localização baixa da parcela.

Em parcelas de alta altitude não é frequente a prática de renovação de pastos.

Tomando em consideração apenas as pastagens de baixa altitude, verificou-se que as pastagens permanentes têm 5,4 vezes maior probabilidade de apresentarem a infestante.

Os sinais de herbivoria para o feto comum verificou-se em pastagens infestadas utilizadas por qualquer dos grupos etários, sendo significativamente superior nas pastagens permanentes (78%) que nas pastagens renovadas (58%).

Tabela 2.1. Variáveis com diferenças significativas em relação à presença do feto comum nas parcelas; a – pastos localizados a alta altitude; b - pastos localizados a baixa altitude; p - pastos permanentes; r - pastos renovados; ⁽¹⁾ % - percentagem de parcelas com infestação pelo feto, dentro da categoria indicada.

Variáveis	N.º de Observações (n)	% ⁽¹⁾	Qui-quadrado p	Odds ratio OR (IC 95%)
Altitude das parcelas (baixas <i>versus</i> altas)	365	b - 90 a - 72	0,00054	3,74 (1,57 - 8,77)
Tipo de pasto (permanentes <i>versus</i> renovados)	363	p - 92 r - 78	0,00048	3,13 (1,53 – 6,40)
Altitude das parcelas em pastos permanentes (baixa <i>versus</i> alta)	275	b - 95 a - 70	<0,00001	7,97 (2,92 – 21,81)
Tipo de pasto em parcelas de apenas baixa altitude (permanentes <i>versus</i> renovados)	326	p - 77 r - 46	<0,00001	5,39 (2,34 – 12,51)

Foi estimado um risco acrescido de 2,6 para o consumo de feto em pastagens permanentes, especialmente nas pastagens a baixa altitude (OR=2,97) (Tabela 2.2). Se observarmos separadamente as parcelas com pastagem permanente e infestadas pelo feto comum, o consumo desta planta é significativamente maior nas pastagens de baixa altitude, com um OR de 2,68. Em apenas 19 % destas pastagens não se observaram sinais de consumo do feto comum, contra 39% nas pastagens permanentes em altitude.

Tabela 2.2. Variáveis com diferenças significativas em relação ao consumo de feto comum

observado: a - pastos alta altitude; b - pastos baixa altitude; p - pastos permanentes; r - pastos renovados; % - percentagem das parcelas infestadas onde se observou consumo do feto comum

Variáveis	N	%	Valor p	Odds ratio OR (IC 95%)
Pastos permanentes <i>versus</i> renovados	321	p – 78 r – 58	<0,00081	2,60 (1,41 – 4,77)
Pastos permanentes <i>versus</i> renovados (somente em pastos baixa altitude)	293	p – 81 r – 58	<0,00019	2,97 (1,59 – 5,56)
Pastos a baixa altitude <i>versus</i> alta altitude (somente em pastos permanentes)	254	b – 81 a – 61	<0,01633	2,68 (1,08 – 6,57)

Na análise por exploração (Tabela 2.3), demonstrou-se haver um maior risco de doença ($p < 0,0001$) nas explorações com parcelas onde se observou consumo de feto comum. A presença do feto comum não limitada às barreiras, isto é, nas barreiras e no meio dos prados, representa um risco dez vezes maior de doença (HEB/Tbx) relativamente à presença da planta infestante apenas nas barreiras.

Tabela 2.3. Variáveis com diferenças significativas entre explorações-caso e explorações-controlo; c - *explorações-caso*; ct - *explorações-controlo*; % - presença da variável em *explorações-caso* e *explorações-controlo*

Variáveis	N	%	Valor p	Odds ratio OR (IC 95%)
Sinais de ingestão do feto comum	70	c - 94 ct - 45	<0,00001	19,15 (3,80 – 120,7)
Presença de feto no pasto e barreiras <i>versus</i> feto só na barreira (não no pasto)	70	c - 82 ct - 30	0,00003	10,63 (2,80 – 42,88)
Heterogeneidade de idade e tamanho nas manadas de novilhas	70	c - 96 ct - 75	0,00815	8,00 (6,25 – 84,00)
Heterogeneidade de idade e tamanho nas manadas de vitelos	70	c - 86 ct - 55	0,00526	5,03 (3,21 – 68,90)

A heterogeneidade de idade e/ou tamanho dos animais do mesmo grupo foi também estatisticamente diferente entre as *explorações-caso* e as *explorações-controlo*. As explorações com manadas de novilhas e de vitelos agrupando animais de diferentes tamanhos, revelaram um risco acrescido de HEB/Tbx, nomeadamente 8 e 5 vezes

superior a explorações em que o manejo dos animais é feito de forma a agrupar animais da mesma idade/tamanho.

A aplicação de herbicidas nas parcelas estudadas com infestação pelo feto comum verificava-se apenas em 17% dos casos, ao passo que em 96,6% das situações as infestantes eram cortadas periodicamente, especialmente após o pastoreio e predominantemente no final do Verão.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as explorações-caso e as explorações-controlo quanto aos seguintes parâmetros: densidade da população dos efectivos; produção individual de leite; idade média ao primeiro parto; peso médio ao primeiro parto; localização das parcelas (baixa altitude *versus* alta altitude); proporção de concentrado na alimentação diária; suplementação mineral e vitamínica; aplicação de fertilizantes às pastagens; tratamento das pastagens com herbicidas e origem do abastecimento de água de abeberamento (rede pública, ribeira, charco na pastagem).

2.3.3. Rejeições por tumores de bexiga nas diferentes classes etárias de bovinos

Nos últimos 10 anos (Jan/2000 a Dez/2009) foram abatidos no MISM 221 729 bovinos, dos quais foram reprovados para consumo devido à presença de Tbx, 17 306 carcaças (7,8%), de diferentes faixas etárias. As vacas leiteiras no final da sua vida produtiva (vacas paridas com mais de 2 anos de idade) representaram o grupo mais atingido por esta doença, tendo-se constado que de 117 755 vacas abatidas, 16 986 (14,4%) foram reprovadas para consumo por revelarem no exame *post-mortem* a presença de neoplasias vesicais (Tab. 2.4). Os Tbx representam a principal causa de rejeição total de carcaças MISM, sendo responsáveis por 48,0% do total de rejeições, quando se incluem todas as faixas etárias. Quando se considera apenas o grupo das vacas leiteiras, (fêmeas paridas com mais de 2 anos) a percentagem de reprovações de carcaças por Tbx ascendeu a 58,5%, relativamente ao total de reprovações nesta categoria durante o período mencionado.

A categoria das fêmeas não paridas, foi o segundo grupo mais atingido pela HEB, contudo, numa percentagem muito inferior (apenas 2,46%) a seguir ao das vacas paridas com mais de 2 anos. No grupo dos bovinos machos até 2 anos de idade (novilhos), apenas 0,16% foram reprovados para consumo por apresentarem Tbx.

Tabela 2.4. Total de bovinos abatidos e rejeitados por tumores de bexiga (Tbx), agrupados por classes etárias (categorias) no Matadouro Industrial de São Miguel no período compreendido entre Janeiro de 2000 a Dezembro de 2009; Tbx = Tumores de bexiga.

Categoria	Total de bovinos abatidos	Rejeições por Tbx	Rejeições por Tbx versus total de abatidos (%)
Vacas paridas >2 anos	117 755	16 986	14,42
Fêmeas não paridas	5 610	138	2,46
Machos castrados	539	3	0,56
Bovinos machos >2 anos	11 782	77	0,65
Vitelos machos < 220 kg	11 553	33	0,28
Novilhos <2 anos	42 723	69	0,16
Vitelas < 220 kg	29 133	1	0,01
Totais	219 095	17 307	7,89

2.3.4. Rejeições por tumores de bexiga na população de vacas importadas abatidas

Constitui um facto notável o facto de nas vacas importadas abatidas a taxa de reprovação de carcaças devido à presença de Tbx ser de apenas 5,8% (Tab. 2.5) e de se registarem os primeiros casos apenas a partir dos sete anos de idade (Fig. 2.3).

Tabela 2.5. Incidência de tumores de bexiga nas vacas importadas abatidas e idade média respectiva (Rej Tbx = rejeições por tumores de bexiga).

Ano	nº de vacas abatidas	Nº RejTbx	% Rej Tbx	Idade média
2001	393	5	1,3	6,84
2002	235	16	6,8	7,14
2003	315	16	5,1	9,30
2004	196	17	8,7	9,86
2005	139	14	10,1	9,84
2006	90	11	12,2	10,2
2007	62	9	14,5	11,43
Total	1430	88		
Média			6,2	9,22

Na população de vacas importadas abatidas verificou-se um crescimento exponencial em função da idade na taxa de rejeição por Tbx. (Gráfico 1.1). Os primeiros casos diagnosticados de HEB/Tbx nas vacas importadas registaram-se em animais com idade igual ou superior a 7 anos.

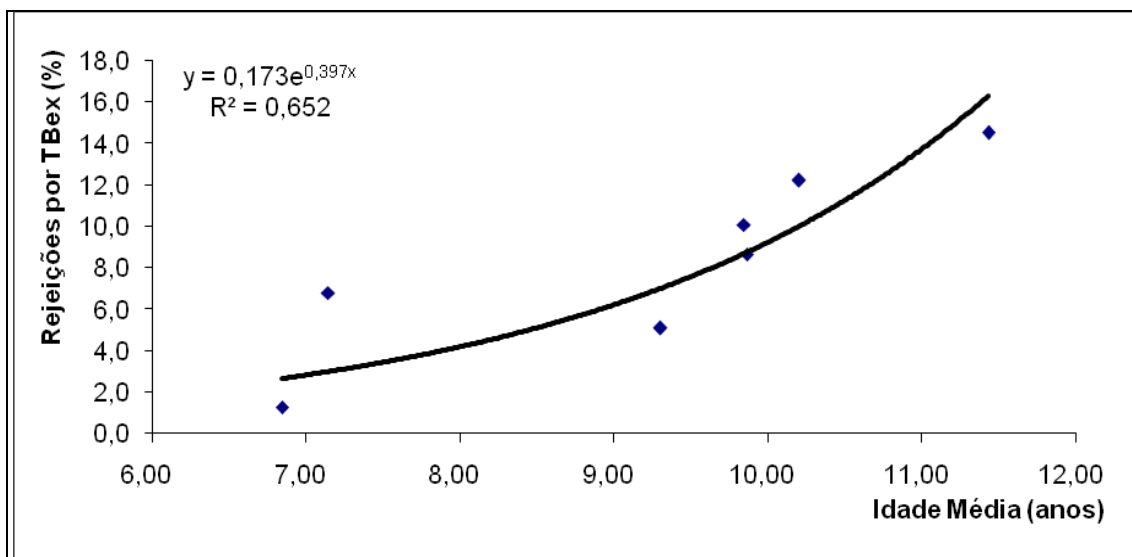


Gráfico 2.1. Crescimento exponencial das rejeições por tumores de bexiga (Tbx) em função da idade das vacas abatidas.

2.3.5. Monitorização da incidência dos tumores de bexiga nas vacas abatidas no período compreendido entre Julho de 1989 e Dezembro de 2009

No gráfico 2.2 podem visualizar-se os resultados da monitorização da incidência dos Tbx nos bovinos abatidos no MISM, no período compreendido entre 1 de Julho de 1989 e 31 Dezembro de 2009.

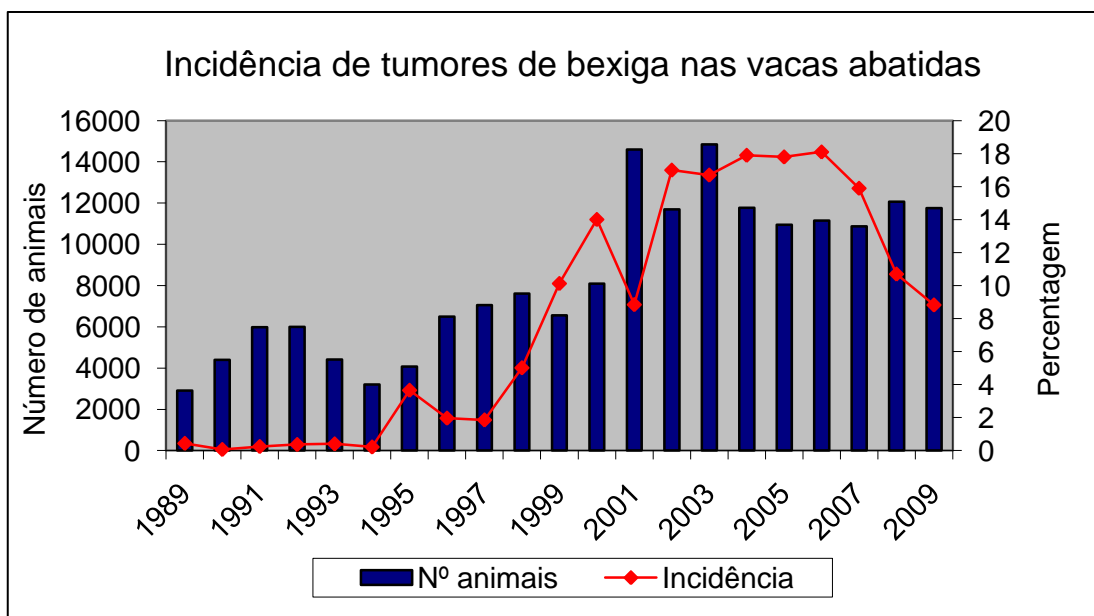


Gráfico 2.2. Monitorização da incidência de tumores de bexiga nas vacas abatidas no Matadouro Industrial de São Miguel (MISM) no período compreendido entre 1 de Julho de 1989 e 31 de Dezembro de 2009. Fonte: Serviço de Inspeção Sanitária do MISM.

2.3.6. Determinação das áreas e explorações de maior incidência de hematúria enzoótica bovina

Na tabela 2.6 apresentam-se os dados relativos à evolução do número de explorações e de vacas leiteiras candidatas ao programa *POSEIMA vacas leiteiras* na ISM, desde 1995 a 2007. Apresenta-se ainda o número total e percentual de explorações que apresentaram para abate no MISM pelo menos uma vaca com diagnóstico de Tbx no *exame post-mortem*, bem como o número total de Tbx diagnosticados em cada ano.

Tabela 2.6. Dados anuais do número de vacas leiteiras e de explorações na ilha de São Miguel, distribuição total e percentual de explorações com pelo menos um caso diagnosticado de tumor de bexiga no Matadouro Industrial de São Miguel (MISM) e número total de tumores diagnosticados no período compreendido entre Jan/95 a Dez/08. Fonte: Serviço de Inspeção Sanitária do MISM, Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos e *POSEI* vacas leiteiras.

Ano	Vacas Leiteiras	Nº de Explorações	Explorações com Tumores de Bexiga (%)	Tumores de Bexiga
1995	47922	2093	190 (9,1)	232
1996	49790	2102	155 (7,4)	182
1997	50108	2101	130 (6,2)	160
1998	52119	2132	326 (15,3)	418
1999	53037	2089	439 (21,0)	628
2000	53476	2026	573 (28,3)	1028
2001	51892	1945	793 (40,8)	1423
2002	52325	1917	899 (46,9)	1879
2003	49260	1847	1006 (55,0)	2224
2004	49587	1810	1082 (59,8)	2101
2005	48937	1711	903 (52,8)	1992
2006	48610	1659	829 (50,0)	1664
2007	51685	1369	700 (41,0)	1369
2008	49927	1564	579 (37,0)	987
2009	50352	1540	512 (33,2)	849

No gráfico 2.3 apresenta-se a evolução ocorrida desde Jan/95 até Dez/09 no número de explorações afectadas por Tbx.

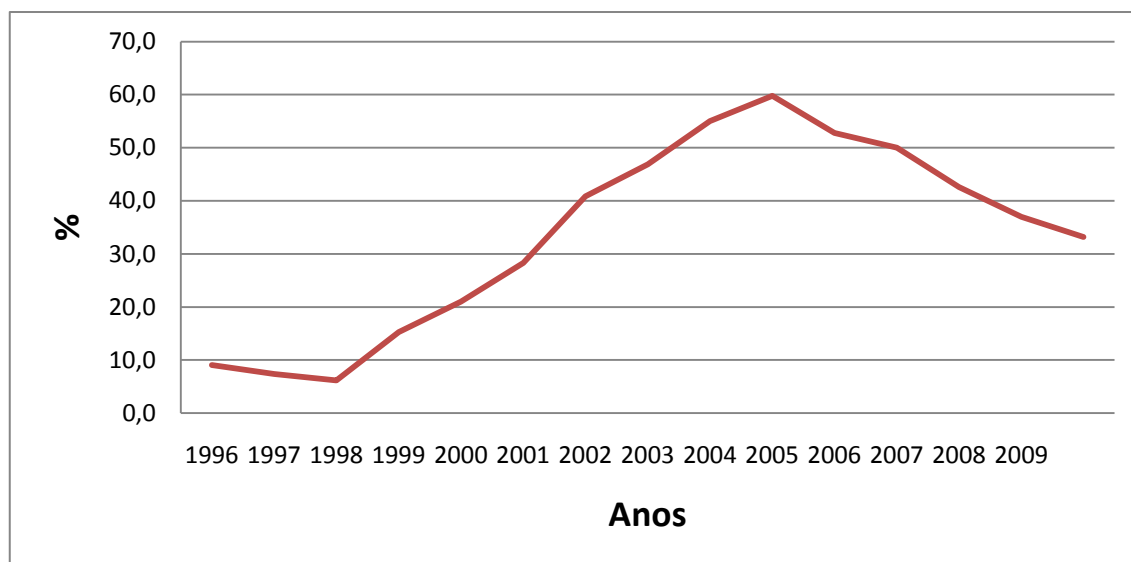


Gráfico 2.3. Evolução do número de explorações de bovinos leiteiros afectadas por tumores de bexiga desde 1995 até 2008

A distribuição geográfica anual das explorações com Tbx identificados no MISM possibilitou a identificação das áreas mais afectadas pela HEB/Tbx na ISM, conforme se ilustra nos mapas da Fig. 2.4.

Figura 2.4 Distribuição geográfica pelas 59 freguesias da Ilha de São Miguel dos tumores de bexiga (Tbx) diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel desde o ano de 1995 a 2009 (Ver página 66).

2.3.7. Relação da distribuição geográfica dos tumores de bexiga com a altitude e a orografia

O mapa da altimetria e orografia da ISM possibilita a comparação com os mapas da destruição dos Tbx pelas 59 freguesias desta Ilha. Nas freguesias com pastagens situadas a baixa altitude (<200m) e com orografia mais irregular parece haver uma maior proporção de explorações atingidas por HEB/Tbx (Fig. 2.5).

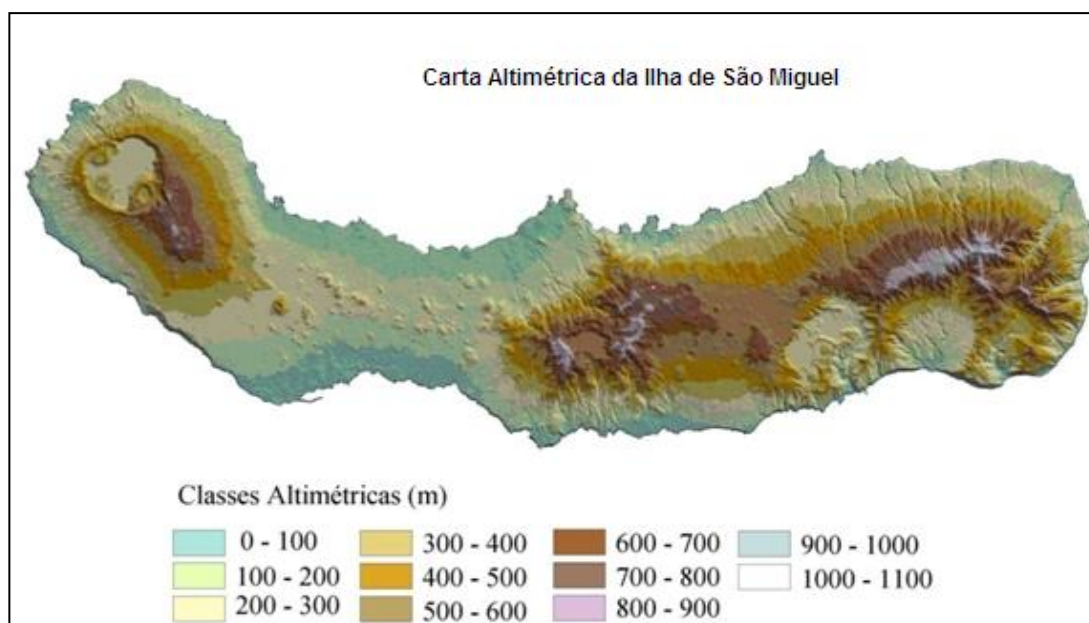


Figura 2.5. Mapa da Ilha de São Miguel com as diferentes altitudes e orografia

2.3.8. Determinação dos valores de ptaquilósido nas explorações com problemas de intoxicação pelo feto comum

Foram colhidas e analisadas cerca de 50 amostras de feto comum das pastagens para análise do Pta. Os resultados obtidos apontam para valores médios elevados desta toxina, superiores a $2\,500\,\mu\text{g g}^{-1}\text{ MS}$ nos rebentos e frondes tenras da planta (Tabela 2.7). São considerados elevados os teores de ptaquilósido acima de $500\,\mu\text{g g}^{-1}\text{ MS}$ (Smith et al., 1988).

Tabela 2.7. Valores de ptaquilósido em 50 amostras de rebentos e frondes de feto comum (*Pteridium aquilinum*), colhidas em pastagens de explorações com problemas de hematúria enzoótica bovina e/ou com casos diagnosticados de intoxicação aguda pela planta.

Amostras	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
(n=50)	$\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g.g}^{-1}$	
• Rebentos e frondes (n=45)	2 533	374	8 841	1 977
• Rebentos (n=3)	4 924	3 795	6 526	ND
• Frondes secas e castanhas (n=2)	24	33	15	ND

2.4. Discussão

As condições edafo-climáticas existentes na ISM favorecem fortemente a presença e a persistência do feto comum. O clima dos Açores é ameno, com temperaturas médias anuais de cerca de 18°C e amplitude térmica de mais ou menos 9°C (SREA,1998). É possível visualizar nas pastagens de baixa altitude frondes verdes e tenras do feto comum mesmo nos períodos de Inverno. No Continente Europeu e em outras regiões do Globo onde se verificam geadas, as frondes do feto comum ficam castanhas e morrem logo que se registam temperaturas negativas. A exposição prolongada às toxinas do feto comum, associada a deficiências no manejo alimentar animal e na gestão das pastagens, e às inadequadas ou inexistentes práticas de controlo desta infestante, podem explicar a infestação crescente das pastagens e do número progressivamente mais elevado de casos de HEB. De facto, os bovinos estão expostos de modo continuado às plantas infestantes, especialmente nas pastagens de baixa altitude, onde se registam os índices mais elevados de ingestão do feto comum. A ingestão do consumo do feto comum pelos bovinos acontece em todos os grupos etários. Esta constatação pode explicar o facto de ter sido em explorações e áreas geográficas da ISM com elevada prevalência de HEB/Tbx que se identificou maior número de ocorrências clínicas de intoxicação aguda pelo feto comum em vitelos e novilhas (Pinto et al., 2007).

Pode explicar-se a ingestão voluntária e continuada do feto comum pelos bovinos por diversos factores entre os quais se destacam: (i) a existência de períodos de escassez forrageira e situações de fome (Evans et al., 1954 a, b, c; Lawson,1989); (ii) carências em fósforo nas forragens produzidas à base de azevém e trevo branco, que levam a perversão do apetite (Naylor e Ralston, 1991), com consumo de plantas ricas neste nutriente, como é o caso do feto comum (Morrow, 2000); (iii) carência em cobalto nos solos e plantas, mais acentuada em algumas regiões da ISM (Barbosa, 1949; Toste, 1953; Pinto et al., 2008), que é também considerada uma causa de apetite desviante nos bovinos, manifestando-se pela apetência para a ingestão de casca de árvores (Peixoto, 2006, comunicação pessoal); (iv) alguns autores apontam a carência de fibra em pastos novos suculentos como uma causa possível para justificar a ingestão do feto comum (Evans et al., 1954 c). Todas as situações apontadas podem ocorrer nos bovinos da ISM. Foram identificadas carências forrageiras em fósforo (Pereira, 1993; Pinto et al., 2007 a). Foram diagnosticadas carências em cobalto desde meados do século passado (Barbosa, 1949; Toste, 1953) e estas foram confirmadas recentemente (Pinto et al., 2008). Têm sido observados comportamentos alimentares anómalos, como o consumo de casca de criptoméria em grupos de novinhos

explorados no Posto Experimental de Culturas de Altitude (PECA) da ISM e submetidos a ensaios com e sem suplementação em cobalto. A confirmação da carência em cobalto baseou-se em dados analíticos realizados no soro, para a vitamina B₁₂ (indicadora do estado nutricional em cobalto nos ruminantes). Estes dados foram posteriormente corroborados pela resposta positiva à administração de cobalto, quer em termos de ganhos de peso quer em melhoria de alguns parâmetros hematológicos, no grupo de novilhos suplementado (Pinto et al., 2007, dados não publicados).

A ingestão prolongada de Pta foi considerada o principal factor de risco de IAF e de HEB nos bovinos. Os rebentos novos e tenros do feto comum são as partes da planta que apresentam maiores níveis de Pta e que são mais facilmente consumidas pelos bovinos, por serem mais apetecíveis (Smith, 1997). Além disso, quando não se procede à remoção da massa vegetal produzida após o corte das plantas, permite-se que os animais comam os resíduos secos que veiculam ainda os compostos tóxicos do feto comum. Constatou-se que a maioria dos bovinicultores da ISM usava esta prática de corte do feto comum, designada localmente por “*roçar do feito ou feto*”, após o pastoreio dos bovinos, promovendo a sua ingestão pelos animais e exacerbando os seus efeitos tóxicos por maior ingestão de Pta e de outras toxinas eventualmente presentes. Na generalidade dos casos, todas as pastagens infestadas pelo feto comum são submetidas a um ou mais cortes por ano, realizadas na sua maioria no final do Verão e início do Outono, de forma a possibilitar algum crescimento forrageiro e subsequente pastoreio no período de Inverno. Neste período do ano as frondes do feto entram em senescência, ficando amarelecidas e castanhas, apresentando menor toxicidade para os bovinos, por conterem menores valores de Pta (Tab.2.7). Pelo contrário, os rizomas armazenam energia na forma de amido e continuam o seu crescimento por via vegetativa subterrânea, preparando-se para emergir na forma de rebentos na estação seguinte.

A significativa variação detectada na utilização de concentrados e de suplementos vitamínicos e minerais utilizados pelos produtores das explorações da amostra, sugere que urge ser revisto o planeamento e o manejo da dieta animal de acordo com as necessidades fisiológicas e de produção dos animais de cada faixa etária.

A heterogeneidade de idade e/ou tamanho dos animais dentro do mesmo grupo é um indicador de deficiente manejo e/ou de carências minerais, especialmente em oligoelementos, como ficou demonstrado no estudo de carências realizado (Cap.4).

Constatou-se que nas explorações-caso os grupos etários mais jovens (vitelas e novilhas) eram mais heterogéneos, em idade e em tamanho que nas explorações-

controlo. Este facto releva a necessidade da constituição criteriosa dos diferentes grupos de bovinos em pastoreio, de forma a evitar fenómenos de dominância social e competição excessiva pelo alimento por parte dos bovinos mais corpulentos do grupo. Algumas das explorações mais afectadas pela HEB incluíam num só grupo os bovinos de todas as faixas etárias, implicando desta forma a exacerbação dos fenómenos de dominância social pelos animais mais corpulentos da manada e agravando a competição pelo alimento.

Constata-se pela análise dos resultados compilados na tabela 2.4, que o grupo das fêmeas paridas com mais de 2 anos de idade (composto na quase totalidade por vacas leiteiras no final da sua vida produtiva) é o mais atingido pela HEB. Este facto parece dever-se à maior longevidade deste grupo de bovinos e ao maior tempo de exposição ao principal factor de risco da doença: as toxinas do feto comum.

A análise dos dados relativos às rejeições por Tbx nas vacas leiteiras importadas e abatidas no MISM, permite corroborar a constatação de que quanto maior é a longevidade dos bovinos, maior é a probabilidade de ocorrência de Tbx. Este facto está de acordo com os dados da literatura científica sobre maior incidência de cancro em populações humanas de idades mais avançadas (Parkin et al., 2005; Cheville, 2006). Os primeiros casos tumorais nas vacas importadas foram diagnosticados em animais com cerca de 7 anos de idade. Este dado pressupõe que as vacas importadas necessitam de pelo menos 5 anos de exposição aos factores de risco da HEB na ISM para desenvolverem a doença.

Nos novilhos até 2 anos de idade a incidência de Tbx é incipiente, cerca de 0,22%. Foi demonstrado que para a HEB ser induzida experimentalmente são necessários mais de 500 dias de exposição às toxinas do feto comum (Pamukcu et al., 1967). Por conseguinte, os novilhos não vivem o tempo suficiente para desenvolverem lesões neoplásicas vesicais e, por outro lado, são explorados em condições diferentes das vacas leiteiras. A cria e recria da maioria dos novilhos na ISM é feita em regime de estabulação, em unidades intensivas, sem acesso ao pastoreio e consequentemente sem exposição ao feto comum. Nos bovinos machos com mais de 2 anos de idade a incidência de Tbx ascendeu para 0,85%, devido à sua maior longevidade e maior probabilidade de exposição aos factores de risco da HEB.

Os dados relativos à monitorização dos Tbx desde Julho de 1989 até Dezembro de 2009 permitiram identificar diferentes períodos na evolução da HEB na ISM. Os factores mais determinantes das variações ocorridas na incidência da doença são os seguintes: (i) programa de compensações monetárias pelo abate de bovinos portadores de tumores, implementado pela SRAP da Região Autónoma dos Açores

(RAA) no ano de 1995 e por períodos bimestrais a partir de 1998; (ii) abertura e observação sistemática de todas as bexigas de todos os bovinos abatidos, durante o exame *post-mortem* de rotina desde Outubro de 1996; (iii) aumento da densidade populacional bovina e melhoria genética considerável do efectivo bovino; (iv) maior utilização de terras marginais onde proliferam numerosas plantas infestantes como o *Pteridium aquilinum*, para pastoreio dos bovinos jovens; (v) carências minerais generalizadas na população bovina com maior gravidade nas novilhas de reposição.

São perceptíveis vários períodos na análise do gráfico 2.2. (i) um primeiro período, compreendido entre o segundo semestre de 1989 até ao final de 1994, em que se regista um baixo número de rejeições por Tbx (<1%) relativamente ao número de vacas abatidas. Durante este período, apenas se abriam e observavam as bexigas dos bovinos que apresentavam hematúria no exame *ante-mortem*; havia um desconhecimento quase generalizado da natureza da doença pelos bovinicultores; foi designado este intervalo de tempo por período de *vigilância passiva da HEB*; (ii) em 1995 regista-se um aumento acentuado (para cerca de 4%) na taxa de reprovação de carcaças por Tbx no MISM; este facto deveu-se à introdução por parte da SRAP da RAA da Portaria dos Carcinomas (Jornal Oficial da RAA, Portaria n.º 7/95 de 16 de Fevereiro da SRAP), que previa o abate de todos os bovinos portadores de tumores malignos e indemnização dos respectivos proprietários (Pinto et al., 1996); (iii) nos anos de 1996 e 1997 registou-se um ligeiro decréscimo na taxa e no número total de reprovações por Tbx. Este facto poderá estar relacionado com a suspensão da Portaria dos Carcinomas, acima mencionada, bem como ao aumento significativo do abate de vacas brucélicas, na sua maioria antes do final da vida produtiva e, conseqüentemente, mais novas que o habitual nos abates verificados noutras circunstâncias; iniciou-se em Out/06 a abertura e observação sistemática de todas as bexigas de todos os bovinos abatidos no MISM, período designado por *epidemiovigilância activa* da HEB, o qual se mantém em vigor; (iv) verificou-se um crescimento exponencial do número de casos de reprovações por Tbx, no período compreendido entre 1998 e 2000; este facto justifica-se pela introdução de novo da Portaria dos Carcinomas e pelo maior conhecimento por parte dos bovinicultores da natureza da doença, o que levou a que todos os bovinos que apresentavam sinais de hematúria fossem conduzidos para o MISM, tendo em perspectiva a atribuição de uma indemnização pela SRAP pelo abate destes animais, o que acabou por acontecer através das Portarias n.ºs. 29/98, 68/99, 82/99, 19/00 e 64/00 publicadas no Jornal Oficial da RAA; (v) no ano de 2001 registou-se uma inflexão notória, para cerca de 9%, na curva ascendente da incidência dos Tbx. Este facto deveu-se ao elevado número

de abates de vacas leiteiras saudáveis, com diluição da percentagem de vacas reprovadas por Tbx, em virtude de se terem ultrapassado as quotas leiteiras definidas pela União Europeia para o arquipélago dos Açores; (vi) a incidência dos Tbx oscilou entre 17 e 18% desde 2002 a 2006, podendo considerar-se a existência de um “plateau” neste período; (vii) finalmente regista-se uma nítida tendência decrescente na incidência dos Tbx no ano de 2009, diminuindo para 8,8% a taxa de reprovações por Tbx.

Segundo os dados do POSEIMA, o número de vacas leiteiras e o número de explorações revelou tendência crescente até ao ano 2000 a 2001. Nesta altura, coincidindo com a viragem do século, assistiu-se à redução progressiva do número de explorações e do número de vacas leiteiras. Um dos factores determinantes desta inversão terá sido a ultrapassagem da quota leiteira no ano 2000, definida para os Açores, pela União Europeia, passando a vigorar um regime de penalizações para os produtores que excedessem a sua quota. Este facto teve como resultado o elevado número de abates de vacas leiteiras, no ano de 2001, antes de terem atingido o final da sua vida produtiva. Outros factores que têm contribuído para a diminuição do número de explorações, com tendência para o aumento do número médio de vacas por exploração, são os parâmetros de qualidade do leite. Estes critérios de qualidade, baseados em contagens de células somáticas e contagens microbianas totais, têm sido progressivamente mais exigentes. Os produtores que não atinjam o limiar aceitável de qualidade são penalizados no preço do leite, levando a que desistam da actividade. O aumento progressivo do custo dos factores de produção, não acompanhado do aumento concomitante do preço do leite, é outro factor de corrosão da economia das explorações.

Desde 1998 até 2004, registou-se uma evolução crescente do número de explorações atingidas pela HEB. A partir de 2005 começou a verificar-se uma inversão da tendência crescente do número total de explorações afectadas pela HEB, bem como do número total de Tbx diagnosticados anualmente no MISM, como se pode constatar na análise dos resultados constantes na Tab. 2.6, nos gráficos 2.2 e 2.3 e nos mapas mencionados na Figura 2.4.

A tendência para estabilização da incidência dos Tbx entre os 17 a 18% nas vacas abatidas a partir de 2002 e a inflexão da curva para 8,8 % no ano de 2009, indicia tendência sustentada para a diminuição do número de casos de HEB. Registou-se um decréscimo do número de explorações atingidas por Tbx de cerca de 60% em 2004

para 33% em 2009, correspondendo a uma redução de 45% neste período (Gráfico 2.3). Este facto sugere que as acções de vulgarização e formação profissional para sensibilização dos produtores para este problema, realizadas em cerca de 50% das freguesias da ISM, bem como as medidas de controlo e erradicação do feto comum em implementação no terreno pelos produtores e entidades oficiais, estão a surtir efeito positivo (Cap. 7. Controlo da HEB). Corroboram esta análise os depoimentos de alguns proprietários de explorações de bovinos mais atingidas pela HEB no passado e que aderiram há mais tempo ao programa de controlo da doença por erradicação do feto comum nas pastagens. Afirmam estes proprietários que alguns anos após a limpeza das pastagens utilizando herbicidas apropriados para o combate ao feto comum, o número de casos clínicos de HEB começou a diminuir nas suas vacas, estando hoje livres da doença.

A diminuição da incidência da HEB parece ter sido mais acentuada nas freguesias da zona central da ISM, permanecendo mais atingidas pela doença as freguesias mais periféricas, localizadas nos extremos ocidental e oriental da ISM. A maior proximidade aos centros urbanos e maior acesso à informação, por parte dos produtores das zonas centrais da ISM, pode ter contribuído para a progressão mais rápida do programa de controlo da HEB.

As freguesias mais atingidas pelo problema da HEB/Tbx são aquelas onde se verifica orografia mais irregular (Fig. 2.5), com pastagens inclinadas, difíceis de lavrar e onde pastoreiam predominantemente os bovinos de faixas etárias mais jovens. São disso exemplo, as encostas Norte e Sul do maciço vulcânico da Lagoa do Fogo, localizadas na zona central da ISM, consistentemente mais afectadas pela HEB pelas razões apontadas. As freguesias situadas a baixa altitude, com terrenos pobres e baixa pluviosidade no Verão, são também das mais atingidas pelos problemas sanitários provocados pela ingestão do feto comum. Nos anos mais secos as únicas plantas que permanecem verdes no Verão nas pastagens de baixa altitude (<200m), sobretudo, junto às sebes e paredes divisórias das pastagens são o feto comum e a *Mentha suaveolens*, devido ao facto destas plantas serem mais resistentes à seca. O feto comum está presente ao longo de todo o ano nas pastagens localizadas a baixa altitude devido às temperaturas do ar mais elevadas e à menor humidade do solo, comparativamente com as pastagens mais altas.

A exposição ao feto comum e o consumo desta infestante pelos bovinos jovens, associada ao corte da planta após o pastoreio, seguida pelo crescimento de novos

rebentos, tenros e mais apetecíveis para os bovinos, são práticas de manejo consideradas de risco para a HEB. As boas práticas de manejo recomendam a não exposição dos bovinos, sobretudo das faixas etárias mais jovens, à planta infestante e o seu corte e remoção da pastagem antes de cada pastoreio.

Os níveis de ptaquilósido (Pta), considerado o principal carcinogénio natural do feto comum, foram muito elevados nas amostragens realizadas desta planta na ISM (Leitão et al., 2006).

É notória a grande variabilidade dos valores de Pta na amostragem efectuada (desvio padrão = 1 977). O valor mais elevado de Pta ($8\,841\ \mu\text{g.g}^{-1}$) foi registado numa exploração com graves problemas de HEB e com casos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF). O valor médio de Pta das amostras colhidas nas explorações onde se registaram casos clínicos de IAF foi de $3\,165\ \mu\text{g.g}^{-1}$, enquanto a média na generalidade das explorações foi de $2\,533\ \mu\text{g.g}^{-1}$. Os rebentos tenros da planta apresentam os níveis médios de toxicidade mais elevados, estando em conformidade com os valores detectados por outros autores (Smith et al., 1988), enquanto as frondes secas e castanhas colhidas no Outono e Inverno são praticamente desprovidas de toxicidade.

3. Hematologia e observações clínicas

3.1. Introdução

Estudos pioneiros levados a cabo por investigadores britânicos, em meados do século passado, permitiram concluir que algumas das toxinas do feto comum possuem efeitos radiomiméticos, visto que imitam os efeitos das radiações ionizantes, como por exemplo os efeitos orgânicos dos raios X (Evans et al., 1954a; Pamukcu et al., 1967; Evans, 1968; Evans et al., 1982). Na tabela 3.1 apresentam-se as similitudes observadas entre a síndrome radioactiva e as alterações induzidas pela ingestão das toxinas do feto comum de forma experimental ou de ocorrência natural, com base no efeito temporal e na dosagem dos respectivos agentes tóxicos. A administração de doses elevadas de radiações, ou de toxinas do feto comum, num curto espaço de tempo desencadeia o aparecimento de alterações nervosas, digestivas e aplasia da medula óssea, enquanto a administração de pequenas doses de forma contínua e prolongada no tempo, pode conduzir ao aparecimento de cancro.

Tabela 3.1. Paralelismo entre as alterações induzidas por radiações ionizantes e as provocadas pela ingestão das toxinas do feto comum (adaptado de Evans, 1968).

	Horas	Dias	Semanas	Anos
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4
	SISTEMA NERVOSO	GASTROINTESTINAL (GI)	MEDULA ÓSSEA (MO)	CANCRO
A	<ul style="list-style-type: none"> • Convulsões • Morte súbita 	<ul style="list-style-type: none"> • Destruição da mucosa GI • Aplasia da medula óssea • Perda de electrólitos • Toxemia sistémica 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplasia prolongada da MO • Hemorragias • Síndrome GI prolongada • Libertação de histamina e heparina • Fragilidade capilar • Alterações humorais 	<ul style="list-style-type: none"> • Osso • Pele • GI • Mama • Pulmão • Leucemia (dependente da espécie e estirpe)
				INDUÇÃO DE MUTAÇÕES
B	<ul style="list-style-type: none"> • Encefalomalácia por défice em tiamina (monogástricos): opistótonus, convulsões e morte 	<ul style="list-style-type: none"> • Destruição da mucosa GI • Aplasia da medula óssea • Perda de electrólitos • Toxemia sistémica <p>Em ruminantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ocorre na intoxicação aguda pelo feto (IAF) 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplasia prolongada da MO • Hemorragias • Síndrome GI prolongada <p>Em ruminantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ocorre na intoxicação aguda pelo feto (IAF) 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinomas do tracto digestivo superior de bovinos • Fibrossarcoma da mandíbula dos ovinos • Neoplasias da bexiga (Hematúria enzoótica dos ruminantes)

Dose decrescente

A. Síndrome radioactiva induzida por raios X e químicos radiomiméticos

B. Síndromes induzidas pelas toxinas do feto comum nos mamíferos domésticos

À semelhança do que acontece com a síndrome radioactiva, a relação temporal causa-efeito estabelecida nos casos de IAF é pouco distanciada no tempo. Diferentes estudos experimentais demonstraram ser possível a indução de IAF em bovinos

jovens através da ingestão de quantidades de feto comum superiores a 500 gr por animal e por dia durante 3 a 10 semanas (Evans et al., 1954b; Singh et al., 1987). Anjos et al., 2009, reproduziram experimentalmente a IAF num grupo de 4 novilhos, com cerca de 1,5 ano de idade e 190 a 225 kg de peso vivo (PV), através da ingestão de feto comum na dose de 8 a 10,6 g por kg de PV, durante um período de 53 a 58 dias. Os primeiros sintomas da IAF começaram a manifestar-se entre os 47 e os 53 dias do início da experiência.

Um grupo de investigadores japoneses reproduziram experimentalmente alguns dos sintomas laboratoriais da IAF num vitelo através da administração oral de ptaquilósido na dose total de 27,2 g durante 47 dias (Hirono et al., 1984c); os primeiros indícios laboratoriais, diminuição acentuada dos neutrófilos, surgiram 50 dias depois do início da experiência. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o Pta tenha um papel preponderante na toxicidade induzida pelo feto comum nos bovinos.

Para a indução experimental da HEB, foi necessária a administração contínua e prolongada de feto comum em pequenas doses (2 g/kg de peso vivo) durante cerca de 550 dias (Pamucku et al., 1967, 1976).

Com base nos estudos anteriormente desenvolvidos e sabendo que as toxinas do feto comum provocam alterações na hematopoiese, por inibição medular da produção das células-mãe das três linhagens de células sanguíneas: mielóide, eritróide e megacariocítica (Evans et al., 1982; Barros et al., 1987; Anjos et al., 2009), foram desenvolvidos os trabalhos seguintes:

1. Caracterização clínica e epidemiológica dos surtos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF) em bovinos;
2. Identificação de situações sub-clínicas de intoxicação pelo feto comum em novilhas de explorações muito afectadas pela HEB, tendo em vista a detecção precoce de bovinos em risco de desenvolvimento desta doença;
3. Avaliação das alterações nos parâmetros hematológicos nos bovinos com sinais clínicos de HEB; comparação com valores obtidos numa população de bovinos clinicamente saudáveis.

Partiu-se do pressuposto que do estudo aprofundado dos surtos de IAF de ocorrência natural nos Açores, se poderiam tirar ilações importantes para o conhecimento etiopatogénico da HEB. Avaliaram-se as condições de manejo alimentar dos bovinos nas explorações com casos de IAF, a presença e grau de infestação das pastagens

pelo feto comum, sinais de herbivoria, gestão do pastoreio e identificação de práticas de risco para a HEB. Devido à dissociação temporal de cerca de 2 anos entre a gênese ou iniciação do processo carcinogénico e aparecimento dos primeiros sinais da HEB, assumiu-se a dificuldade do estabelecimento de uma relação causa-efeito nesta doença. Procurou-se ainda identificar outros factores considerados de risco para o desenvolvimento de HEB, através da análise de parâmetros hematológicos de bovinos com e sem exposição ao feto comum.

Os parâmetros hematológicos avaliados neste estudo foram os seguintes: eritrócitos, hemoglobina (Hgb), hematócrito, índices eritrocitários, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e plaquetas (Tab. 3.2). Os parâmetros mencionados no intervalo de referência podem variar, dentro de certos limites, em função da idade e do tipo de bovino, bem como entre laboratórios e equipamentos utilizados (Brun-Hansen et al., 2006; Jones e Allison, 2007).

Tabela 3.2. Parâmetros hematológicos avaliados, unidades e intervalo de referência: Fonte: Jain, 1993; Brun-Hansen et al., 2006

Parâmetros	Unidades internacionais	Unidades utilizadas	Intervalo de referência
• Eritrócitos	$10^{12}/L$	$10^6/\mu L$	5,0-10,0
• Hemoglobina	g/L	g/dL	8,0-15,0
• Hematócrito	L/L	%	24-46
• VCM	fL	fL	40-60
• CMHC	g/L	%	30-36
• Leucócitos	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	4,0-12,0
• Neutrófilos	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	0,6-4,0
• Linfócitos	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	2,5-7,5
• Monócitos	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	0,25-8,4
• Eosinófilos	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	0,0-2,4
• Basófilos	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	0,0-0,2
• Plaquetas	$10^9/L$	$10^3/\mu L$	100-800

Os eritrócitos são produzidos na medula óssea como resposta à eritropoietina produzida sobretudo pelo rim; são responsáveis pelas trocas gasosas e transporte de

oxigénio e dióxido de carbono nos tecidos, por intermédio do grupo hemo (estrutura porfirínica com átomo de ferro no centro). A Hgb representa a capacidade de transporte de oxigénio dos eritrócitos. Os índices eritrocitários estudados foram o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração média de Hgb corpuscular (CMHC):

- $$\text{VCM} = \frac{\text{hematócrito (\%)}}{\text{eritrócitos} \left(\frac{\text{milhões}}{\mu\text{l}} \right)} \times 10, \text{ expresso em fentolitros (fl): } 10^{-15};$$
- $$\text{CMHC} = \frac{\text{Hemoglobina} \left(\frac{\text{g}}{\text{dl}} \right)}{\text{Hematócrito (\%)}} \times 100, \text{ expressa em \% ou g/dl};$$

O VCM e a CMHC são parâmetros de avaliação morfológica dos eritrócitos e permitem classificar as anemias (Tab. 3.3). O VCM é indicador do tamanho médio dos eritrócitos da amostra analisada. Designa-se por microcitose, macrocitose e normocitose, quando o tamanho médio dos eritrócitos é inferior, superior, ou se enquadra dentro do intervalo de referência, respectivamente (Jain, 1993; Jones e Allison, 2006). A CMHC indica o teor médio de Hgb dos eritrócitos e possibilita a sua classificação em normocrómicos, hipocrómicos e hiperocrómicos, quando a concentração de Hgb se encontra dentro dos valores de referência, abaixo e acima do normal, respectivamente (Jain, 1993; Jones e Allison, 2006). Nos vitelos saudáveis o VCM encontra-se normalmente abaixo dos valores de referência para os bovinos adultos, processo designado por microcitose (Brun-Hansen et al., 2006). É normal existirem em circulação macrócitos ou micrócitos nos ruminantes (Jones e Allison, 2007), esta variação de tamanho dos eritrócitos designa-se por anisocitose. Quando a anisocitose é muito marcada poderá ter significado diagnóstico, estando relacionada com a presença de eritrócitos grandes policromatófilos, característicos de resposta regenerativa da medula óssea (Jones e Allison, 2007).

Para além da inflamação crónica e da insuficiência renal crónica, são causas de anemia não-regenerativa as carências nutricionais, como a falta de proteínas, e ácidos aminados, o défice em ferro, cobre e cobalto, bem como as doenças intrínsecas da medula óssea, que incluem a toxicidade pelo feto comum (Watson e Canfield, 2000; Jones e Allison, 2007).

Os leucócitos granulócitos, tal como todas as outras linhagens de células do sangue, são produzidos e amadurecidos na medula óssea (Kramer, 2000; Jones e Allison, 2007). Os linfócitos embora originários das células-tronco, “stem cells”, da medula óssea, possuem a particularidade de proliferar e de maturar noutros tecidos linfóides.

Têm ainda a capacidade de recircular entre o sangue e os tecidos (Jones e Allison, 2007). Os neutrófilos são os leucócitos dominantes nos ruminantes jovens. Nos bovinos adultos os linfócitos tornam-se os leucócitos dominantes, com uma relação neutrófilo *versus* linfócito de 1 para 2 (Morris e Large, 1990). Os linfócitos são predominantemente células B ou T. Os linfócitos B produzem anticorpos, enquanto os linfócitos T participam na regulação imunitária e citotoxicidade imuno-mediada (Jones e Allison, 2007). Os monócitos participam na resposta imunitária entrando nos tecidos a partir da circulação para se tornarem macrófagos, capazes de fagocitar agentes infecciosos, partículas e resíduos celulares.

Tabela 3.3. Classificação morfológica das populações eritrocitárias e das anemias. Fonte: Jain, 1993; Watson e Canfield, 2000; Brun-Hansen et al., 2006; Jones e Allison, 2007

VCM (40-60 fL)	CMHC (30-36 g/dL)	Significado
• Microcítica	• Hipocrômica	Carências em ferro e cobre; perdas crônicas de sangue
• Microcítica	• Normocrômica	Deficiência em ferro em progressão
• Macrocítica	• Hipocrômica	Anemia em remissão, por perdas de sangue ou por hemólise
• Macrocítica	• Normocrômica	Deficiência em vitamina B ₁₂ ; deficiência em cobalto; anemia regenerativa (em remissão ou hemolítica)
• Normocítica	• Normocrômica	Morfologia eritrocitária normal; anemias por depressão medular
• Normocítica	• Hipocrômica	Fase inicial da deficiência em ferro
• Normocítica	• Hiperocrômica	Não se verifica nos ruminantes domésticos

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos; funcionam como um rolhão hemostático que adere aos vasos lesados de forma a manter a sua integridade. A presença de petéquias e hemorragias nas mucosas são sinais clínicos que requerem a avaliação plaquetária (Jones e Allison, 2007).

3.2. Material e métodos

3.2.1. Caracterização clínica e epidemiológica dos surtos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF) em bovinos

Os 29 casos estudados ocorreram em bovinos de raça Holstein-Friesian, provenientes de 24 explorações de bovinos leiteiros de três ilhas do arquipélago dos Açores: 22 de São Miguel, uma da Terceira uma de São Jorge. A maior parte dos surtos de IAF foram referenciados por clínicos veterinários das Associações Agrícolas da Ilha de São Miguel, desde 1995 até 2005.

O diagnóstico da doença baseou-se na anamnese e no exame clínico dos bovinos afectados, complementado com hemograma. Em seis bovinos prepararam-se esfregaços de medula óssea esternal que foram corados pelo método de Wright (Jain, 1993). Foi realizada necrópsia em 15 bovinos e foram colhidas amostras para exame histopatológico e microbiológico. O conteúdo dos reservatórios gástricos foi observado para identificação de fragmentos de *P. aquilinum*.

As amostras de sangue foram colhidas na veia jugular quando as novilhas tinham menos de um ano e na veia da cauda quando tinham idade superior a um ano.

Os hemogramas foram realizados em contador automático modelo Hemavet 850 (*CDC Technologies Inc.*). As amostras de sangue de 29 bovinos suspeitos de IAF foram colhidas para tubos com EDTA potássico (*Sarstedt Monovette®*) e foram comparadas com outras provenientes de um grupo de 77 bovinos clinicamente saudáveis (controlos), não expostos ao feto comum, pertencentes a 7 explorações de bovinos leiteiros sem registo de casos de HEB ou de IAF. A selecção das explorações-controlo foi realizada com recurso à base de dados sobre HEB e tumores de bexiga do programa de monitorização das neoplasias diagnosticadas no MISM, existente no SDASM.

Foram visitadas as explorações e as pastagens onde ocorreram os surtos para identificação do feto comum e procura de sinais de herbivoria, pela evidência de corte da extremidade das frondes e dos rebentos com maior palatabilidade. Procurou-se identificar nas explorações visitadas e com registo de ocorrências de IAF, factores de risco para o aparecimento de situações de intoxicação aguda ou crónica pelo *Pteridium aquilinum*.

Em 20 amostras de frondes e rebentos tenros de feto comum realizaram-se exames toxicológicos para pesquisa de ptaquilósido, por cromatografia líquida de alta pressão (Agneux e Lauren, 1991). Na tentativa de investigar a razão da ingestão do *P. aquilinum* pelos bovinos foram ainda determinados, em 10 amostras desta planta, os

valores de potássio e fósforo por espectrofotometria de absorção atómica no Laboratório de Química do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores.

A análise estatística dos dados utilizou os programas *Microsoft Excel 2003* e a aplicação estatística *SPSS v.13* para a aplicação do teste T aos parâmetros que apresentam uma distribuição normal e do teste não paramétrico de Mann-Whitney aos parâmetros que não seguem uma distribuição normal, com o objectivo de comparar os dois grupos de animais, com e sem sintomas de IAF.

3.2.2. Identificação de situações sub-clínicas de intoxicação pelo feto comum em novilhas de explorações muito afectadas pela HEB

Foram determinados os valores hematológicos de 64 novilhas clinicamente saudáveis pertencentes a 7 explorações-problema (com casos registados de HEB) e estes foram comparados com 70 novilhas da mesma faixa etária provenientes de 6 explorações-controlo (sem casos registados de HEB).

A selecção das explorações foi realizada com recurso à base de dados sobre HEB e tumores de bexiga do programa de monitorização das neoplasias diagnosticadas no MISM, existente no Serviço de Desenvolvimento Agrário de São Miguel.

A colheita de amostras foi realizada na veia jugular em bovinos com idades iguais ou inferiores a 1 ano de idade, nas novilhas com mais de 1 ano o sangue foi colhido na veia ou artéria da cauda. O processamento das amostras de sangue para realização dos hemogramas, bem como a análise estatística dos resultados foram similares aos realizados no ponto anterior.

Parâmetros hematológicos em vacas com sinais clínicos de HEB

Tendo em vista caracterizar o tipo de anemia que ocorre normalmente nos bovinos com sintomas clínicos de HEB e identificar os mecanismos etiopatogénicos subjacentes, foi realizado um estudo dos parâmetros hematológicos registados em 56 bovinos afectados por esta doença.

As amostras de sangue para o estudo hematológico foram colhidas de 38 vacas que apresentaram hematúria no exame *ante-mortem* no MISM e de 18 casos clínicos identificados em 7 explorações de origem dos animais. Os procedimentos de colheita e análise das amostras foram idênticos aos mencionados nos pontos anteriores.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterização clínica dos surtos de intoxicação aguda pelo feto comum em bovinos

A maioria das ocorrências de IAF em bovinos dos Açores foi registada no período compreendido entre Abril e Outubro, sendo mais frequentes nos meses de Maio, Junho, Agosto Setembro e Outubro (Gráfico. 3.1).

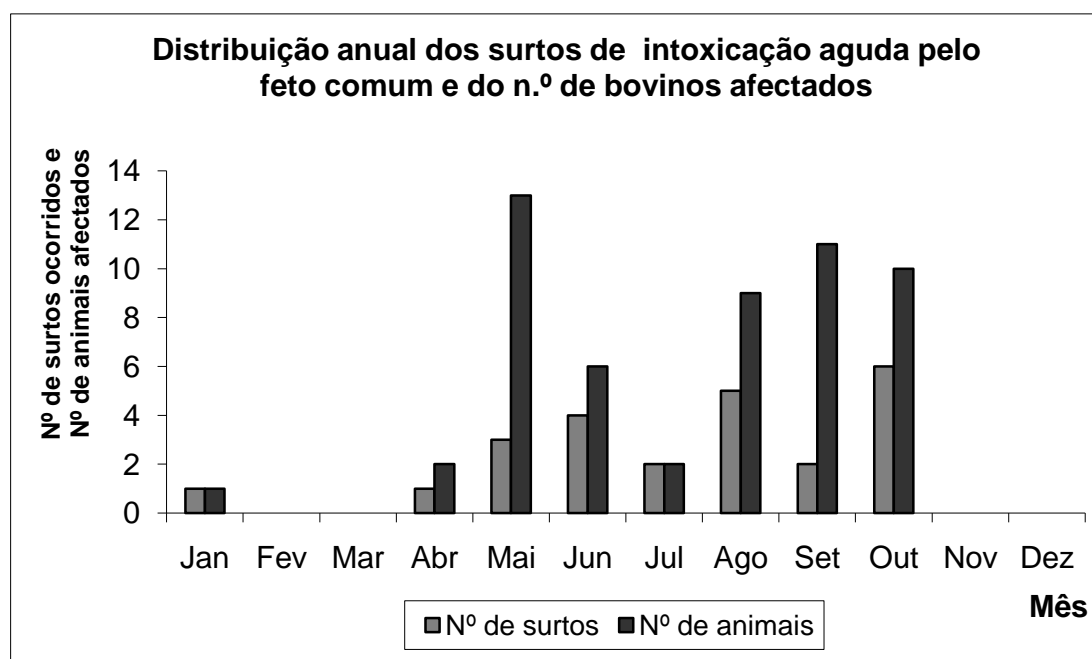


Gráfico 3.1. Distribuição anual das ocorrências clínicas registadas de intoxicação aguda pelo feto comum (*Pteridium aquilinum*) em bovinos dos Açores, relativas aos anos compreendidos entre 1995 e 2005.

Os casos descritos ocorreram em grupos de 3 a 50 novilhas de raça Holstein-Friesian, provenientes de 24 explorações. Os animais afectados tinham idades compreendidas entre os 4 e os 21 meses.

No conjunto das explorações afectadas, compreendendo um total de 248 bovinos jovens, foram identificados 47 casos, correspondendo a uma taxa de morbilidade de 19%. A taxa de mortalidade registada no grupo de bovinos afectados por IAF foi de 77%, tendo a morte ocorrido poucos dias após a observação dos primeiros sinais da doença.

Cerca de 70% dos surtos foram observados em novilhas exploradas em regime de pastoreio livre, rotativo, controlado por cerca eléctrica, ou por sebes e paredes divisórias. As ocorrências restantes (30%) foram registadas em novilhas que se encontravam na pastagem presas a uma estaca por corrente metálica fixada na canela ou no pescoço. Na maioria das explorações, os grupos de novilhas eram heterogéneos, pois continham animais com idades e tamanhos díspares, alguns com

má condição corporal, pelagem acastanhada e baça (acromotriquia) sugestiva de carência em minerais e/ou parasitismo intenso (Fig. 3.1).



Figura 3.1. Grupo heterogêneo de novilhas em exploração com casos de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF). A novilha da esquerda com pelagem castanha (acromotriquia) e de menor tamanho apresentava sinais clínicos de IAF, tendo vindo a morrer. Os fetos apresentam a extremidade superior das frondes, porções mais tenras e palatáveis consumidas pelos animais (herbivoria). São Vicente Ferreira, Mai/97.

Alguns dos bovinos observados apresentavam infestações por piolhos (*Linognathus vituli*). No geral, os animais afectados pela IAF apresentavam má condição corporal. Nas pastagens onde ocorreram os surtos de IAF identificou-se o *Pteridium aquilinum* com sinais de herbivoria (Fig. 3.1.). Os principais sinais clínicos observados foram depressão do estado geral, hemorragias cutâneas nas áreas mais expostas aos insectos picadores: orelhas, focinho e membros (Fig. 3.2. e 3.3.), ou no local de inoculação de medicamentos (Fig. 3.4-C e 3.5-A).



Figura 3.2. Hemorragias cutâneas, no pescoço, orelhas e focinho em novilha com intoxicação aguda pelo feto comum. Evidencia-se a acromotriquia e debilidade orgânica geral devida a anemia intensa. São Vicente Ferreira, Mai/97.



Figura 3.3. Hemorragias cutâneas: (A) nas orelhas, (B) focinho e (C) membro posterior; (D) equimose na esclera. Novilha com intoxicação aguda pelo feto comum. São Vicente Ferreira, Mai/97.



Figura 3.4. Sintomas de intoxicação aguda pelo feto comum: (A) Úlceras na mucosa labial e mufla; (B) petéquias na mucosa vaginal (C) hematoma na região glútea direita de vitela, consecutiva a administração medicamentosa



Figura 3.5. Sintomas de intoxicação aguda pelo feto comum em novilha de exploração com graves problemas de hematuria enzoótica: (A) Presença de hemorragia consecutiva a administração medicamentosa na coxa direita, cerca de 5 horas após a aplicação e sinais de diarreia com sangue: fezes com muco sero-sanguinolento aderentes aos pêlos da cauda; (B); conjuntiva ocular com petéquias (C). diarreia com sangue nas fezes, recentemente emitidas e depositadas na pastagem Faial da Terra, Maio/2003.

Os principais motivos da consulta referidos pelos proprietários dos bovinos suspeitos de IAF foram a ocorrência de “*suores de sangue*” (hematidrose), diarreia com sangue,

apatia, anorexia, polipneia, suspeita de pneumonia e morte súbita em alguns animais. Duas das ocorrências registadas de IAF foram observadas ocasionalmente, durante as visitas programadas no âmbito do estudo da etiopatogenia da HEB, previstas no presente trabalho e que incluíram o acompanhamento de explorações de bovinos com incidência elevada de HEB, para identificação de factores de risco associados a esta patologia. A ocorrência reportada na Fig. 3.5, ilustra bem esta situação: esta exploração foi visitada devido ao facto de apresentar incidência anormalmente elevada de HEB e Tbx, conforme mencionado nos registos do programa de monitorização da HEB existente no SDASM. No dia da visita, 3 de Maio de 2003, enquanto observávamos as pastagens e os bovinos desta exploração, constatamos existir uma novilha doente e que tinha sido tratada, pelo proprietário sem recurso a aconselhamento veterinário, contra a diarreia. Observamos o animal e verificamos que este apresentava uma hemorragia na coxa direita, consecutiva à administração intramuscular de *Trivetrim*[®], Schering Plough (sulfamida com trimetropin), indicada para o tratamento de diarreias de origem infecciosa. Realizado o exame físico pode constatar-se que a novilha apresentava mau estado geral, acromotriquia, gotejava sangue no local da inoculação do medicamento e apresentava sinais de diarreia com sangue; a temperatura rectal era 36,5º C, as mucosas vaginal, oral e conjuntiva apresentavam petéquias. Este animal sucumbiu no dia 4 de Maio, cerca de 24 horas após a nossa observação. Foi realizada necrópsia que evidenciou um quadro lesional característico da IAF (Fig. 3.6).

A exploração visitada localizava-se da no Faial da Terra, uma freguesia da ISM, das mais atingidas pela HEB/Tbx (Fig. 2.4).

A diarreia foi muitas vezes o sinal mais proeminente (Fig. 3.5-A), sendo fluida nos estádios iniciais. Com o evoluir do processo as fezes evidenciavam muco sanguinolento e finalmente coágulos de sangue moldados ao intestino. Com frequência foram observadas, úlceras ou pequenas erosões naso-labiais (Fig. 3.4-A). A conjuntiva ocular apresentava-se congestionada numa fase inicial da doença; com o evoluir do processo tornava-se pálida, com petéquias e por vezes equimoses na esclera (Fig. 3.3-D). A córnea de alguns bovinos apresentava úlceras e erosões de dimensão variável e algumas sequelas de processos anteriores de querato-conjuntivite infecciosa por *Moraxella bovis*. A mucosa vaginal das vitelas e novilhas afectadas apresentava petéquias (Fig. 3.4-B), mesmo na ausência de outros sinais, sendo este um dos indicadores mais precoces de IAF. Apenas uma das novilhas, observada numa

fase terminal da doença, apresentava mucosas ictericas, com valores aumentados de bilirrubina no soro.

Nas tabelas 3.1 e 3.2 apresentam-se os valores hematológicos comparados entre os grupos de novilhas afectadas por IAF e novilhas provenientes de explorações sem casos registados de IAF e HEB.

Tabela 3.1 Valores hematológicos em bovinos com sinais de intoxicação aguda pelo feto comum e em bovinos saudáveis (controlos). A vermelho assinalam-se os parâmetros que mais se desviam da normalidade. \pm SD = Desvio padrão; VCM = Volume corpuscular médio; CMHC = concentração média de hemoglobina corpuscular *Fonte: Jain,1993.

Parâmetros	Doentes (n=29) Média Min.-Máx. \pm SD	Controlos (n=77) Média Min.-Máx. \pm SD	Valores de referência * Média Min.-Máx.	Valor de <i>p</i>
• Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5,2 0,8 - 9,5 2,1	7,9 5,7 - 10,4 1,1	7 5,0 - 10,0	<0,001
• Hemoglobina (g/dl)	5,6 1,7 - 9,9 2,0	8,6 5 - 10,9 1,1	11 8,0 - 15,0	<0,001
• Hematócrito (%)	18,0 5,1 - 37,4 7,0	29,1 16,6 - 43,1 5,0	35 24 - 46	<0,001
• VCM (fl)	36,4 23,3 - 66,4 9,6	37,4 22,8 - 57,2 7,8	52 40 - 60	0,588
• CMHC (%)	31,7 22,9 - 42,7 3,8	29,8 22,8 - 36,1 3,0	32,7 30 - 36	0,010
• Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	59,7 6 - 196 54,5	348,3 53 - 673 138,5	500 100 - 800	<0,001

Constata-se diminuição significativa (valor de $P < 0,001$) de todos os parâmetros analisados nos bovinos doentes, com especial relevância para o número de plaquetas, que diminui de uma forma drástica nos bovinos com sintomas de IAF.

A contagem total de leucócitos e das populações leucocitárias apresenta-se na tabela 3.2. A comparação com dados hematológicos de bovinos saudáveis (controlos)

permitiu registar diferenças significativas em todos os parâmetros analisados. O conjunto da informação clínica e laboratorial obtida conduziu ao diagnóstico de intoxicação aguda pelo feto comum (IAF).

Registaram-se diferenças significativas (valor de $P < 0,001$) entre os dois grupos de bovinos para todos os parâmetros leucocitários analisados (Tabela 3.2). O teste de Mann-Whitney revelou diferenças significativas para os valores absolutos de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Tabela 3.2. Valores leucocitários de bovinos com sinais de intoxicação aguda pelo feto comum e bovinos saudáveis (controles). A vermelho assinalam-se os parâmetros que mais se desviam da normalidade. \pm SD = Desvio padrão. *Fonte: Jain, 1993.

Parâmetros	Doentes (n=18) Média Min-Máx \pm SD	Controlos (n=77) Média Min-Máx \pm SD	Valores de referência* Média Min-Máx	Valor de p
• Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2,5 0,7-5,5 1,3	10,4 5,3-18,5 2,5	8 4,0-12,0	<0,001
• Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,21 0,03-0,7 1,18	3,55 1,20-6,96 1,16	2 0,6-4,1	<0,001
• Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2,14 0,60-5,2 1,18	5,69 2,69-9,97 1,39	4,5 2,5-7,5	<0,001
• Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,13 0,02-0,6 0,13	0,73 0,17-2,87 0,45	0,4 0,025-0,84	<0,001
• Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,03 0,00-0,16 0,04	0,38 0,03-1,72 0,41	0,7 0-2,4	<0,001
• Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,00 0,00-0,04 0,01	0,03 0,00-0,13 0,03	0,05 0-0,2	0,004

Os linfócitos, embora em número inferior aos valores de referência no grupo problema, não foram tão afectados pelas toxinas do feto comum como os neutrófilos e os eosinófilos.

O exame por citologia aspirativa da medula óssea revelou uma medula hipocelular por hipoplasia mielóide e eritróide e aplasia megacariocítica. Registaram-se ainda alterações de maturação da série eritróide com sinais de deseritropoiese. Nos aspirados de medula óssea obtidos de bovinos não expostos às toxinas do feto

comum, observou-se uma medula normocelular com maturação eritróide normal e presença de número normal de representantes da série megacariocítica nos seus vários estádios de maturação (Fig. 3.6).

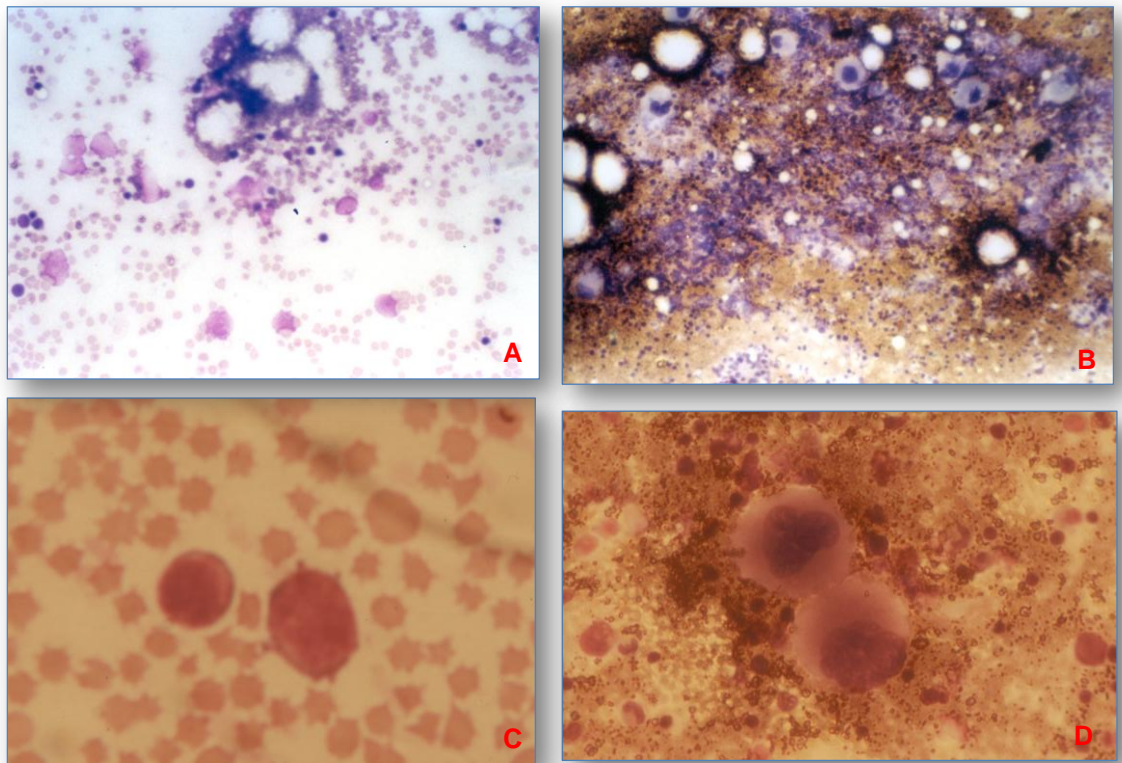


Figura 3.6. O exame por citologia aspirativa da medula óssea esternal das novilhas com sintomas de intoxicação aguda pelo feto comum mostrou uma medula hipocelular com aplasia megacariocítica (A e C); o esfregaço da medula de novilhas não expostas ao feto comum (B e D) apresentava-se normocelular, com contagem normal de , de megacariócitos em vários estádios de maturação. Coloração de Wright (20x: A e B; 100x:C e D).

Na necrópsia registaram-se alterações congestivo-hemorrágicas nas fascias de tecido conjuntivo subcutâneo, omento e serosas dos órgãos digestivos (Fig. 3.7). No exame da cavidade torácica observaram-se com frequência lesões de pneumonia, pleurisia com aderências à parede costal, e petéquias e equimoses extensas no epicárdio. Em dois cadáveres, na abertura da traqueia e brônquios observaram-se intensas infestações por *Dictyocaulus viviparus*. A abertura dos órgãos do tubo digestivo revelou presença de petéquias e sufusões hemorrágicas (Fig. 3.7-A); erosões e úlceras na mucosa do abomaso e intestino, por vezes com extensas áreas de enterite, necrose e até ruptura intestinal (Fig. 3.7-B). Registaram-se petéquias na mucosa da vesícula biliar e da bexiga (Fig. 3.8-C). Em alguns cadáveres foi possível observar a presença de fragmentos de feto comum no conteúdo ruminal (Fig. 3.7-D).



Figura 3.7. (A) Hemorragias em toalha na serosa ruminal); (B) necrose com ruptura intestinal; (C) petéquias e sufusões hemorrágicas na mucosa da bexiga, iniciação da carcinogénese?; (D).fragmentos de *Pteridium aquilinum* no conteúdo ruminal

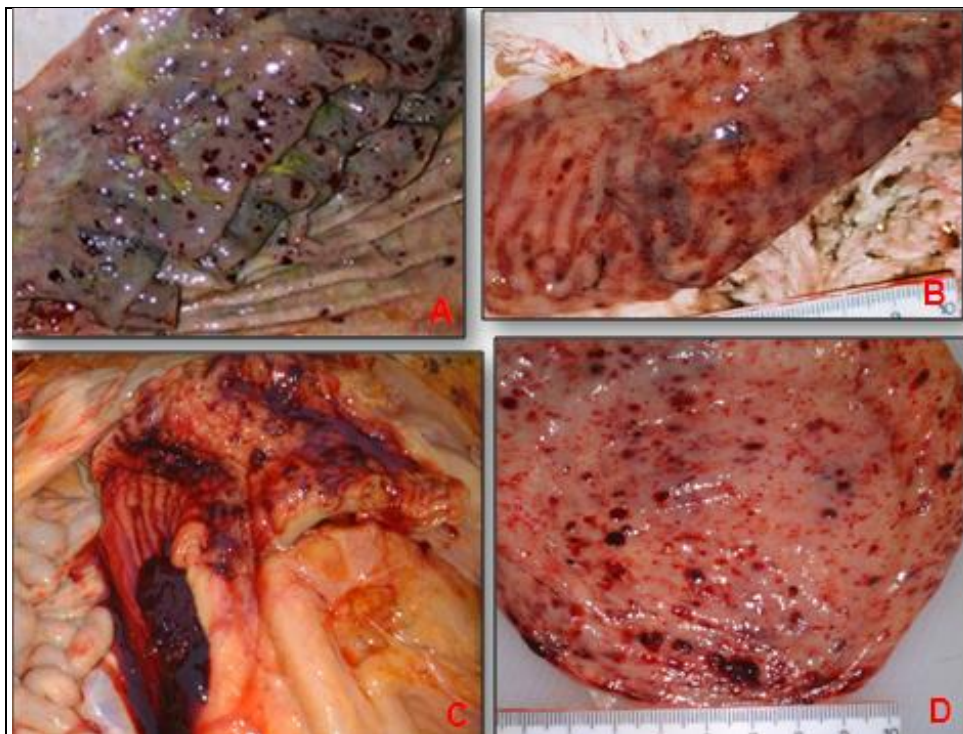


Figura 3.8. (A) Petéquias e úlceras na mucosa abomasal; (B) enterite e úlcera no cólon; (C) espessamento da parede do íleo com extensas lesões hemorrágicas e coágulo no lume intestinal; (D) cistite com petéquias e úlceras na mucosa da bexiga.

Os resultados histopatológicos revelaram presença de enterite necrosante com destruição das vilosidades, acentuado edema e hemorragia epitelial, infiltração inflamatória da submucosa, vasos trombosados e necrose do tecido linfático com presença de aglomerados bacterianos. No abomaso observaram-se hemorragias focais e edema da submucosa. Em algumas amostras de fígado observaram-se imagens de necrose centrolobular e por vezes hepatite necrótica multifocal dispersa, com presença de aglomerados bacterianos. A nível dos linfonodos havia sinais de depleção linfóide caracterizada por uma diminuição no número e dimensões dos folículos.

Os valores de ptaquilósido, potássio e fósforo, obtidos na análise de amostras de feto comum colhidas em pastagens onde ocorreram surtos de IAF em bovinos apresentam-se na Tab. 3.4. A análise de 20 amostras desta infestante revelou um teor médio de 3 165 $\mu\text{g g}^{-1}$ de ptaquilósido (Pta). Registou-se, contudo, uma grande variabilidade nos valores obtidos ($\pm\text{SD}=1\ 701$). Os valores de fósforo do feto comum foram comparados com aqueles obtidos por Pereira, 1993, em amostras de azevém e trevo branco de pastagens micalenses. Os níveis de fósforo nestas plantas forrageiras encontram-se abaixo dos valores mínimos aconselhados para bovinos (Lambert et al., 1991, citado em Pereira, 1993).

Tabela 3.4. Valores de ptaquilósido, potássio e fósforo em amostras de feto comum (*Pteridium aquilinum*), azevém (*Lolium perenne*) e trevo branco (*Trifolium repens*), colhidas em pastagens micalenses. Fonte: Pereira, 1993

Espécie de planta	Ptaquilósido	Potássio	Fósforo
	($\mu\text{g g}^{-1}$)	(g Kg^{-1})	(g Kg^{-1})
	Média	Média	Média
	Mín - Máx $\pm\text{SD}$	Mín - Máx $\pm\text{SD}$	Mín - Máx $\pm\text{SD}$
• Feto comum (n=20 para o Pta e n=10 para o K e P)	3 165 614 - 8 441 1 701	21,7 14,6 - 31,6 5,1	5,0 3,2 - 12,2 2,7
• Azevém ⁽¹⁾ (n=83)	0	32,45	3,27
• Trevo branco ⁽¹⁾ (n=88)	0	25,73	3,24
• Valor mínimo aconselhado (g. Kg^{-1} MS) ⁽¹⁾	0	5,5	4,0

$\pm\text{SD}$ = desvio padrão; Pta = ptaquilósido; K = potássio; P = fósforo; MS = matéria seca

3.3.2. Identificação de situações sub-clínicas de intoxicação pelo feto comum em novilhas de explorações muito afectadas pela HEB

Os resultados obtidos no estudo hematológico comparativo entre novilhas pertencentes a explorações com e sem problemas de HEB, apresentam-se nas tabelas 3.5 e 3.6.

Tabela 3.5. Eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas em duas populações de novilhas, clinicamente saudáveis, pertencentes a explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica bovina; \pm SD = Desvio Padrão. VCM = Volume corpuscular médio; CMHC = concentração média de hemoglobina corpuscular. *Fonte: Jain, 1993.

Parâmetros	HEB (n=64) Média Min.-Máx. \pm SD	Controlos (n=70) Média Min.-Máx. \pm SD	Valores de referência * Média Min.-Máx.	Valor de <i>p</i>
• Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6,3 3,55 - 8,26 1,0	7,8 5,13 - 11,34 1,2	7 5,0 - 10,0	<0,001
• Hemoglobina (g/dl)	7,5 5 - 9,9 1,2	8,6 5 - 10,9 1,1	11 8,0 - 15,0	<0,001
• Hematócrito (%)	26,6 18,1 - 38,8 3,6	29,1 16,6 - 43,1 5,0	35 24 - 46	<0,001
• VCM (fl)	42,3 25,6 - 63,5 8,6	38,2 22,8 - 61,4 8,4	52 40 - 60	0,007
• CMHC (%)	28,6 23,6 - 33,3 2,8	29,4 22,8 - 35,3 2,9	32,7 30 - 36	0,079
• Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	303,9 19 - 665 136,8	349,6 53 - 673 144,2	500 100 - 800	0,062

Registaram-se diferenças significativas entre as duas populações de novilhas nos parâmetros seguintes: eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Saliencia-se ainda o facto de todos os parâmetros mencionados na Tabela 3.5., apresentarem valores abaixo dos de referência, com excepção dos parâmetros eritrocitários nas novilhas provenientes das explorações sem problemas de HEB.

Todos os parâmetros leucocitários mencionados na Tabela 3.6 se encontram dentro dos valores de referência em ambas as populações de novilhas; contudo, nos animais provenientes de explorações com problemas de HEB os valores leucocitários são inferiores aqueles apresentados pelos controles. As maiores diferenças entre os dois grupos de novilhas foram observadas no número de leucócitos e de neutrófilos totais.

Tabela 3.6. Leucócitos em duas populações de novilhas pertencentes a explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica bovina; \pm SD = Desvio Padrão. *Fonte: Jain, 1993.

Parâmetros	HEB (n=64) Média Min-Máx \pm SD	Controles (n=70) Média Min-Máx \pm SD	Valores de referência* Média Min-Máx	Valor de p
• Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	9 3,32-20,8 2,5	10,5 7,12-18,54 2,5	8 4,0-12,0	0,001
• Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2,9 0,83-12,2 1,6	3,6 1,20-6,96 1,16	2 0,6-4,1	0,005
• Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5,2 2,14-7,68 1,2	5,7 2,69-9,97 1,4	4,5 2,5-7,5	0,018
• Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,6 0,18-1,41 0,3	0,8 0,17-2,87 0,45	0,4 0,025-0,84	0,013
• Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,29 0,01-0,74 0,4	0,39 0,03-1,72 0,4	0,7 0-2,4	0,152
• Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,02 0,00-0,37 0,1	0,03 0,00-0,13 0,03	0,05 0-0,2	0,537

3.3.3. Parâmetros hematológicos em vacas com sinais clínicos de HEB

Os resultados obtidos no estudo hematológico de bovinos com sinais clínicos de HEB apresentam-se nas Tabelas 3.7. e 3.9. A classificação morfológica das anemias observadas nesta população apresentam-se na Tabela 3.8.

Tabela 3.7. Parâmetros eritrocitários e plaquetários obtidos em duas populações de vacas de raça Holstein-Friesian: 61 com sinais clínicos de hematúria enzoótica bovina e 164 clinicamente saudáveis. VCM = Volume corpuscular médio; CMHC = Concentração média de hemoglobina corpuscular; \pm SD = Desvio Padrão. *Fonte: Jain, 1993.

Parâmetros	HEB (n=61) Média Min.-Máx. \pm SD	Controlos (n=164) Média Min.-Máx. \pm SD	Valores de referência * Média Min.-Máx.	Valor de p
• Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	3,63 1,3 - 6,9 1,44	6,29 3,83 - 10,59 1,16	7 5,0 - 10,0	<0,001
• Hemoglobina (g/dl)	4,67 1,8 - 8,8 1,78	8,25 5,4 - 10,9 1,09	11 8,0 - 15,0	<0,001
• Hematócrito (%)	18,15 8,1 - 28,8 5,72	27,8 19,5 - 43,1 4,05	35 24 - 46	<0,001
• VCM (fl)	52,4 31,1 - 103,8 13,32	44,75 28,1 - 57,2 5,3	52 40 - 60	<0,001
• CMHC (%)	25,4 18,4 - 32,4 3,12	29,79 24,3 - 35,4 2,03	32,7 30 - 36	<0,001
• Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	297 61 - 685 152	362,3 43 - 729 119,3	500 100 - 800	<0,01

Tabela 3.8. Classificação morfológica das anemias observadas numa população de 61 vacas com sintomas clínicos de hematúria enzoótica bovina, com base no volume corpuscular médio (VCM) e na concentração média de hemoglobina corpuscular (CMHC).

Classificação morfológica das anemias	nº de animais	%
Normocíticas hipocrômicas	42	68,9
Macrocíticas hipocrômicas	14	23,0
Microcíticas hipocrômicas	4	6,6
Normocíticas normocrômicas	1	1,6
Total	61	100,0

Tabela 3.9. Valores leucocitários de bovinos com sinais de hematúria enzoótica e bovinos saudáveis (controles); \pm SD = Desvio padrão. *Fonte: Jain, 1993.

Parâmetros	Doentes (n=61) Média Min-Máx \pm SD	Controles (n=164) Média Min-Máx \pm SD	Valores de referência* Média Min-Máx	Valor de p
• Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7,26 3,08-22,92 4,32	9,01 2,84-17,06 2,37	8 4,0-12,0	<0,01
• Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3,16 0,93-11,17 3	3,65 0,85-11,22 1,62	2 0,6-4,1	0,768
• Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3,02 1,11-15,3 2,49	4,43 1,18-8,63 1,49	4,5 2,5-7,5	<0,001
• Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,83 0,14-4,88 1,43	0,63 0,09-2,87 0,38	0,4 0,025-0,84	<0,001
• Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,21 0,01-1,29 0,28	0,27 0,00-1,72 0,33	0,7 0-2,4	0,164
• Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,01 0,00-0,03 0,01	0,02 0,00-0,29 0,03	0,05 0-0,2	<0,001

3.3.4. Identificação de práticas de manejo consideradas de risco para o aparecimento de toxidade pelo feto comum

Durante a visita realizada às explorações atingidas por problemas de toxidade pelo feto comum identificaram-se práticas de manejo alimentar e de gestão das pastagens que foram consideradas de risco, ou favorecedoras do aparecimento de casos de HEB, Tbx e IAF, tais como: a) corte do feto comum após o pastoreio, seguida de ressurgimento de rebentos tenros, mais palatáveis (Fig. 3.10-A e 3.10-A₁); b) exposição prolongada dos bovinos, sobretudo das faixas etárias mais jovens, ao feto comum.



Figura 3.9. Novilhas pertencentes a uma exploração com problemas de HEB. É evidente o mau manejo alimentar e a fraca condição corporal dos animais. Maio/2001.



Figura 3.10. Práticas de risco associadas à intoxicação aguda ou crónica pelo *Pteridium aquilinum* na ilha de São Miguel. A. Corte do feto comum após o pastoreio, seguida do aparecimento de rebentos tenros (A1), mais palatáveis e com maior teor de ptaquilósido (Ribeira Seca, Out/2001); B. Exposição prolongada de novilhas ao feto comum em pastagens muito infestadas pelo feto comum; na imagem visualiza-se uma novilha presa a corrente metálica, nesta exploração registaram-se casos de IAF (Arrifes, Jun/2004). C. Pastagem de baixa altitude, no Verão de 2002, pertencente a exploração muito atingida por casos de HEB/Tbx, evidenciava-se a presença abundante de *P. aquilinum*, junto à parede divisória; salienta-se o facto de que as únicas plantas que permanecem verdes serem o feto comum e a silva (Rabo de Peixe, Ago/2002); D. Novilha a pastorear junto à sebe da pastagem, após se ter

cortado a erva para produção de silagem; foi registado um surto de IAF num grupo de novilhas pertencentes a esta exploração (Candelária, Mai/2004).

Pode observar-se bovinos presos a estacas por correntes metálicas em pastagens muito infestadas por *P. aquilinum* (Fig. 3.9 e 3.9-B); c) exposição dos bovinos ao feto comum comum durante o pastoreio em pastagens de baixa altitude, muito secas no Verão, onde abunda o feto comum, sobretudo junto às sebes e paredes divisórias das pastagens (Fig. 3.10-C e 3.10); d) colocação das novilhas a pastorear em parcelas de pastagem onde foram realizados, recentemente, cortes para produção de silagem de erva; nestas condições apenas permanece disponível para consumo, alguma erva residual junto às barreiras divisórias da pastagem e abundam plantas infestantes como o *P. aquilinum* (Fig. 3.10-D); e) inexistência de qualquer tipo de suplementação com concentrados, forragem alternativa à erva da pastagem e/ou fornecimento de suplementos minerais (Fig. 3.9 e 3.10-B); f) constituição de lotes heterogêneos de novilhas que possibilitam o aparecimento de fenómenos de dominância social e de consequente disputa pelo alimento, com vantagem para os animais mais corpulentos (Fig. 3.1); g) ausência de água à discrição para os bovinos presos à estaca.

Na Figura 3.11 podem visualizar-se a ingestão de feto comum e uma vaca com sintomas clínicos de HEB, pertencentes a exploração com inúmeros casos de HEB.



Figura 3.11. Vacas de exploração muito atingida por casos clínicos de hematúria enzoótica e com elevado número de registos de reprovações por tumores de bexiga no MISM. Pastagem de baixa altitude muito infestada por *Pteridium aquilinum* e *Mentha suaveolens*.

3.4. Discussão

Os bovinos atingidos pela IAF foram, na quase totalidade, novilhas de substituição de raça Holstein-Frisiean, com idades compreendidas entre os 4 e os 21 meses.

A distribuição anual das ocorrências clínicas de IAF nos Açores parece acompanhar o aumento da biomassa disponível do feto comum, que atinge o seu valor máximo no final da Primavera até ao início do Outono (Leitão et al., 2006). Pelo contrário, apenas se registou uma ocorrência de IAF nos meses compreendidos entre Novembro e Março (Jan/05), coincidindo com a maior escassez de *P. aquilinum*. É no final do Verão e princípio do Outono que se verificam períodos de maior escassez forrageira, sobretudo nas pastagens de baixa altitude (<200 m), sendo muitas vezes o *P. aquilinum* a única planta verde disponível (Fig. 3.10 e 3.11). Esta planta infestante é abundante sobretudo junto às paredes e sebes divisórias das áreas de pastoreio das explorações com problemas de HEB na ilha de São Miguel (Pinto et al., 2000). Constitui uma prática comum, por parte dos bovinicultores, o corte mecânico do feto comum após o pastoreio dos bovinos nos meses de Verão (Fig.3.10-A e A₁), seguindo-se o aparecimento de novos rebentos da planta, com maior palatabilidade e níveis mais elevados de Pta, no pastoreio seguinte. A rotação de pastoreio realiza-se com intervalos de cerca de 3 a 4 semanas, período este que possibilita o crescimento de novos rebentos de feto comum na pastagem. Este facto poderá contribuir para o maior número de ocorrências clínicas de IAF nos meses de Agosto a Outubro (Gráfico 3.4).

Na generalidade dos casos, os bovinos que compunham os grupos onde foram diagnosticados os casos de IAF consumiam apenas erva em regime de pastoreio, sem qualquer suplemento mineral ou alimento concentrado. Numa das explorações em que constatámos haver distribuição de alimento concentrado, este era fornecido em pequena quantidade e, como o grupo era heterogéneo, havia dominância social por parte dos animais mais corpulentos, que impedia o acesso ao alimento dos bovinos mais pequenos (Fig. 3.1). Em algumas explorações com problemas de toxidade aguda e/ou crónica pelo feto comum em bovinos constatou-se que as novilhas são amarradas a estacas por correntes metálicas e por conseguinte, expostas por longos períodos de tempo às toxinas do *P. aquilinum* (Fig. 3.9 e 3.10). O pastoreio com novilhas em pastagens onde foram realizados cortes para produção de silagem de

erva, constitui, ainda, uma prática comum, em muitas explorações micaselenses; nestas condições os bovinos são obrigados a consumir os restos de erva e ervas infestantes que permanecem nas parcelas de pastagem junto às barreiras, sebes divisórias e áreas inacessíveis à máquina de corte de erva para produção de silagem; estas áreas estão normalmente muito infestadas pelo feto comum. A escassez de erva associada a encabeçamentos excessivos e/ou carência de fibra são outros factores que podem induzir os bovinos a consumir as hastes do feto comum (Tokarnia et al., 1967; Barros et al., 1987; Lawson, 1989; Anjos et al., 2008). As carências em fósforo existentes nas plantas forrageiras das pastagens micaselenses, poderão induzir nos bovinos jovens apetite desviante, com tendência para consumo de infestantes ricas em neste elemento como é o feto comum. De facto, a elevada concentração em fósforo doseada em 10 amostras de feto comum (Tab. 3.4) colhidas nas pastagens da ISM pode justificar a apetência dos bovinos por esta planta. É sabido que na generalidade das explorações pecuárias micaselenses, os bovinos jovens são criados em pastoreio sem qualquer suplementação mineral a partir do desmame (Pinto et al., 2001). As carências em fósforo, sódio, potássio e cloro são causa de perversão do apetite nos bovinos (Naylor e Ralston, 1991), podendo justificar a ingestão de plantas tóxicas, como o *P. aquilinum*. A colocação dos bovinos em pastagens infestadas pelo *P. aquilinum*, numa fase do desenvolvimento da planta em que a toxicidade é mais elevada, sem fornecimento adicional de qualquer suplemento alimentar e por vezes sem água à disposição, deverá criar condições propícias ao aparecimento de problemas relacionados com a toxicidade provocada pela ingestão do feto comum.

Nos exames hematológicos realizados aos bovinos com sinais de IAF salientam-se a leucopenia, com diminuição acentuada de todas as populações leucocitárias. A leucopenia com desaparecimento quase total dos leucócitos granulócitos constitui o dado mais proeminente nos casos de IAF. A trombocitopenia foi uma constante em todos os casos de IAF. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por outros investigadores (Evans et al., 1954 a, b, c, e 1982; Barros et al., 1987; Singh et al., 1987; Anjos et al., 2008 e 2009; Gabriel et al., 2009).

As toxinas do feto comum possuem um efeito radiomimético sobre a medula óssea (Evans, 1968; Evans et al., 1982; França et al., 2002), afectando as três linhas celulares: mielóide, megacariocítica e eritróide. Os exames por citologia aspirativa da medula óssea esternal realizados revelaram aplasia das séries megacariocíticas e granulocíticas, com hipoplasia eritrocitária. Foram obtidos resultados similares por Evans et al., 1982 e Anjos et al. 2009, em condições experimentais. Nas séries

eritróides registou-se hipoplasia e alterações morfológicas, com perda da forma biconcâva e aspecto espiculado (Fig. 3.6-C) sugestivas de perda de funcionalidade dos glóbulos vermelhos. As alterações hematológicas verificadas nos bovinos com IAF, sobretudo a trombocitopenia, justificam o quadro hemorrágico do tipo primário observado nos animais com sinais da doença (Fig. 3.2 a 3.5).

Em algumas freguesias da ISM, os produtores mais antigos associam os sintomas da IAF a carbúnculo hemático, também conhecido por antraz, tendo-se instituído como profilaxia a vacinação dos efectivos contra o *Bacillus anthracis* e outras clostridioses. Baseando-se em experiências anteriores, os produtores denominaram algumas áreas geográficas da ilha como sendo terras de “carbúnculo”. Foi possível constatar que estas áreas são actualmente as mais afectadas pela HEB e onde se registaram maior número de surtos de IAF.

A IAF pode confundir-se com septicemias agudas e outras doenças hemorrágicas dos bovinos, tais como: carbúnculo hemático, pasteurelose septicemia, intoxicações por furazolidona, por soja tratada com tricloroetileno e por trevo doce (*Melilotus* spp.), micotoxicoses e radioactividade (McKenzie, 2007).

O diagnóstico diferencial incluiu a leptospirose aguda em bovinos jovens, cujo quadro clínico também se pode caracterizar pelo aparecimento de diátese hemorrágica, com hemorragias cutâneas e petéquias nas mucosas muito semelhantes às registadas na IAF. Em casos observados pelo autor e confirmados como sendo leptospirose, registou-se icterícia, fotossensibilidade, hemoglobinúria, proteinúria com turvação marcada da urina, leucocitose e boa resposta ao tratamento com antibióticos e corticóides, o que não sucedeu na quase totalidade dos casos de IAF submetidos a terapia. A taxa de sucesso da terapia instituída nos casos de IAF foi reduzida (inferior a 25%). Apenas os animais observados e tratados numa fase precoce da doença recuperaram.

As extensas lesões na mucosa do tracto digestivo com necrose intestinal associada à diminuição acentuada dos leucócitos, especialmente os neutrófilos, facilitaram a entrada em circulação de bactérias, com subsequente septicemia e morte por choque séptico. As infecções respiratórias com pneumonia e pleurisia são frequentes nos casos de IAF, sendo uma consequência provável da neutropenia e debilidade orgânica geral provocada pelas toxinas do feto comum, exacerbadas pelas carências minerais e parasitismo observados. Devido ao aparecimento frequente de quadros clínicos de septicemia, os casos de IAF são sub-diagnosticados e muitas vezes confundidos com

pneumonias e diarreias, como se pode inferir pela informação obtida nas visitas realizadas às explorações com elevado número de casos de HEB (Fig. 3.5). Este facto leva-nos a pressupor que alguns casos clínicos de IAF são sub-diagnosticados, ou confundidos com outra patologia pelos produtores e mesmo por alguns médicos veterinários assistentes dessas explorações.

As lesões macroscópicas observadas na mucosa da bexiga dos bovinos afectados pela IAF são semelhantes aos tumores de bexiga observados nos casos de HEB (Fig. 3.7-C e 3.8-D). Esta observação sugere-nos que os casos de IAF poderão representar a parte visível do “iceberg”, que é a toxicidade nos bovinos induzida pelas toxinas do feto comum.

Nos casos de hematúria enzoótica a relação causa-efeito está muito distanciada no tempo, podendo ser superior a dois anos (toxicidade crónica), enquanto os sinais clínicos de IAF ocorrem ao fim de 3 a 8 semanas de ingestão de cerca de 1 kg de matéria seca por dia de frondes verdes de *P. aquilinum* (Evans et al., 1982; Singh et al., 1987), ou de 8 a 10,6 gr por kg de PV (Anjos et al., 2009).

A IAF tem carácter cumulativo e depende dos níveis de toxicidade do feto, avaliada pelo seu teor em Pta. Os valores médios de Pta ($3\ 165\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ MS}$) foram muito elevados nas amostras de frondes colhidas nas pastagens onde ocorreram os surtos de IAF. São considerados elevados os teores de Pta acima de $500\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ MS}$ (Smith, et al., 1994). Os valores de Pta parecem ter sido determinantes na génese dos processos patológicos observados. As explorações com problemas mais graves de HEB e IAF foram aquelas onde se registaram os valores mais elevados de Pta.

O mau manejo alimentar nas novilhas provenientes das explorações com problemas de IAF/HEB (Fig. 3.9 e 3.10) e a exposição prolongada a doses baixas de toxinas do feto comum, poderá justificar as diferenças registadas nos parâmetros hematológicos estudados, quando comparados com novilhas oriundas de explorações sem registo de casos de HEB.

Constatou-se haver hipocromasia ($\text{CMHC} < 30\ \%$) em ambas as populações de novilhas (explorações-controlo e com problemas de HEB); este dado associado à microcitose ($\text{VCM} < 40\ \text{fL}$) registada nas novilhas do grupo controlo é sugestivo de subnutrição e carência em ferro, cobre e cobalto (Jones e Allison, 2007). Os vitelos saudáveis têm normalmente valores de VCM baixos, quando comparados com os bovinos adultos (Brun-Hansen et al., 2006). A microcitose registada nos bovinos dos

Açores com sintomas de IAF (Tab. 3.1), poderá justificar-se, pelo facto destes casos, terem sido observados predominantemente em bovinos jovens.

Considera-se que existe anemia nos bovinos sempre que o hematócrito for inferior a 24%, a contagem de eritrócitos for menor que 5×10^6 células/ μL , ou que concentração de Hgb for abaixo de 8 g/dL (Cole et al., 1997). Os sintomas clínicos compatíveis com a anemia são a presença de mucosas pálidas, fraqueza geral, intolerância ao exercício, depressão mental ou agressão (Jones e Allison, 2007). A anemia é uma anomalia com múltiplas causas e vários diagnósticos diferenciais. Numa primeira abordagem as anemias são subdivididas em regenerativas e não regenerativas, tendo como critério subjacente a morfologia eritrocitária e a contagem de reticulócitos (eritrócitos imaturos e com maior tamanho médio). Nos ruminantes o aumento do VCM e a diminuição da CMHC são também indicativas de anemia regenerativa (Jones e Allison, 2007). As principais causas da anemia regenerativa são a hemorragia e a hemólise. Quando se verificam perdas externas de sangue durante algum tempo o animal pode esgotar as suas reservas de ferro e desenvolver anemia do tipo não regenerativo, se ocorrer depleção das reservas deste nutriente. A hemólise pode ocorrer nos bovinos com carência acentuada de selénio e de fósforo no período pós-parto (Jones e Allison, 2007).

Todas as vacas observadas com HEB, quer no MISM quer nas explorações, apresentaram anemia. Cerca de 66% da população estudada apresentava anemia do tipo normocítico hipocrómico, indicadora de carência em ferro numa fase inicial (Jain, 1993; Harvey, 2000). Constatou-se, ainda, que 25% dos casos observados foram do tipo macrocítico hipocrómico, sugestivos de anemia em fase de remissão, após perdas crónicas de sangue pela urina (Jain, 1993; Tvedten e Weiss, 2000) e/ou, por ausência do efeito depressor medular das toxinas do feto comum. Seguiram-se em frequência as anemias do tipo microcítico hipocrómico, em cerca de 8% dos casos, possivelmente relacionadas com carências em ferro, cobre e cobalto, devidas a perdas crónicas de sangue (Harvey, 2000). Foi apenas observado um caso de anemia do tipo normocítico normocrómico, podendo ser indicativo de depressão medular, doença crónica, fome e ainda deficiência em cobalto (Jain, 1993; Watson e Canfield, 2000).

Registaram-se diferenças significativas em alguns parâmetros leucocitários na população de bovinos com e sem problemas de HEB (Tab. 3.9). O valor total de leucócitos foi inferior nas vacas com HEB, bem como os valores de linfócitos e de basófilos. Registou-se um valor médio mais elevado de monócitos no grupo das vacas

com HEB. A tendência para a monocitose nos casos de intoxicação crónica pelo *P. aquilinum* foi já reportada por outros grupos de investigação, designadamente por Shahin et al., 1998b, Perez-Alenza et al., 2006. O primeiro grupo observou monocitose em ratos aos quais foi administrado por via intra-venosa várias doses de Pta activado. O segundo grupo identificou monocitose em bovinos expostos de forma crónica ao feto comum e apontou este dado como um marcador precoce da toxicidade induzida pelas toxinas do feto comum. No presente estudo apenas identificamos tendência para a monocitose no grupo de bovinos com HEB e não nas novilhas provenientes de explorações com problemas de toxicidade pelo feto comum. No grupo de bovinos com IAF e controlos respectivos também não foi identificada monocitose. A monocitose está geralmente associada a resposta inflamatória crónica (Jain, 1993). São necessários estudos mais alargados e abrangentes para determinar a validade da monocitose como indicador precoce da toxicidade pelo feto comum e da génese da HEB.

Os resultados obtidos no estudo hematológico nas diferentes situações clínicas ou sub-clínicas sugerem o envolvimento de carências minerais na génese dos processos de intoxicação aguda ou crónica pelo *P. aquilinum* nos bovinos dos Açores. Por esta razão foi desenvolvida uma linha de investigação no âmbito deste trabalho, visando aprofundar os conhecimentos sobre a relação existente entre a carência em determinados oligoelementos e a etiopatogenia da HEB. É sabido que os solos de origem vulcânica são naturalmente deficitários em selénio, cobre, cobalto e iodo (Grace, 1994). Por conseguinte, as plantas forrageiras produzidas nestes solos vão reflectir essas carências, tal como os animais que pastoreiam em regime extensivo nestas áreas deficitárias em oligoelementos (Watson e Canfield, 2000).

4. Estudo de carências em oligoelementos e sua relação com a Hematúria Enzoótica Bovina

4.1. Introdução

O estudo analítico das carências em oligoelementos (OE) foi inserido no programa de trabalhos da presente tese, devido a três factores: 1- Resultados obtidos no estudo hematológico que apontaram para a existência de carências minerais na população bovina da ilha de São Miguel, sendo estas mais acentuadas nas explorações com problemas de toxicidade provocada pelo feto comum; 2- Relevância do papel de alguns OE, nomeadamente selénio, cobre e zinco, nos sistemas antioxidantes e mecanismos celulares reparadores das lesões do ADN; 3- Importância para a pecuária açoriana da identificação e correcção das carências minerais nos bovinos.

O zinco, o cobre e o selénio fazem parte de importantes sistemas enzimáticos intra-celulares, com funções antioxidantes e reparadoras das lesões do ADN (Keen e Graham, 1989). Por conseguinte, a carência destes micronutriente pode interferir nas diferentes etapas dos processos carcinogénicos. Os bovinos dos Açores, criados em sistema de pastoreio permanente em solos de origem vulcânica, estão vulneráveis a carências em determinados OE como o selénio, o iodo, o cobre e o cobalto (Fig. 4.1).

- **Micro-minerais ou oligoelementos:**
concentração no organismo em miligramas por Kg
(McDonald et al, 1995)



Elemento	mg/Kg
Ferro	20-80
Zinco	10-50
Cobre	1-5
Molibdénio	1-4
Selénio	1-2
Iodo	0.3-0.6
Manganésio	0.2-0.5
Cobalto	0,02-0.1

Figura 4.1. Oligoelementos essenciais para bovinos em pastoreio. A vermelho assinalam-se os mais deficitários nas regiões vulcânicas como os Açores, sendo o selénio e o iodo os de níveis mais críticos; a azul assinalam-se aqueles que poderão estar em quantidade excessiva no solo.

O presente capítulo apresenta-se subdividido em três partes: 1) uma breve revisão da literatura sobre os OE com maior relevância na população bovina dos Açores; 2)

apresentação da informação obtida no rastreio de OE realizado em 481 bovinos, de 70 explorações, de cinco ilhas do arquipélago açoriano e, finalmente, (3) a informação com os resultados obtidos num ensaio de crescimento de novilhos suplementados com OE, que se realizou no Posto Experimental de Culturas em Altitude (PECA) da ISM. O critério de selecção destes OE foi baseado na informação obtida no rastreio realizado e no modelo pecuário da Nova Zelândia, cujo sistema produtivo é baseado em pastoreio em solos de origem vulcânica com condições edafo-climáticas similares às verificadas no arquipélago açoriano.

4.1.1 Zinco

O Zn é o segundo OE mais abundante nos mamíferos e é um componente funcional de mais de 300 proteínas com funções estruturais, catalíticas e reguladoras (Rollin, 2002; Tomlinson et al., 2004; Surai, 2005); é um elemento fundamental para a integridade das proteínas da cadeia de transporte electrónico e dos domínios proteicos de ligação ao ADN, designados por dedos de zinco (*zinc fingers*); intervém no organismo a nível metabólico, imunitário e hormonal; influencia a expressão de genes, a replicação celular e os mecanismos antioxidantes; faz parte da superóxido dismutase citosólica (Cu-Zn SOD) e de várias proteínas envolvidas na reparação dos danos ocorridos no ADN, tais como a p53 (NRC, 2001; Rollin, 2002; Baker et al., 2003; Surai, 2005).

A deficiência em Zn prejudica as defesas antioxidantes e compromete os mecanismos de reparação do ADN, tornando a célula muito vulnerável ao stress oxidativo. Nos estados carenciais em Zn verifica-se alteração da capacidade de ligação da p53 ao ADN e perda da funcionalidade desta proteína. São ainda afectados pelo Zn outros factores de transcrição sensíveis ao estado redox celular (Ho et al., 2003).

Dadas as numerosas funções do Zn pode-se esperar que a sua carência orgânica tenha um grande impacto na resposta celular ao stress oxidativo e aumente o risco de desenvolvimento de cancro (Ho et al., 2003).

4.1.2 Cobre

O cobre é um elemento indispensável à vida, que se encontra largamente distribuído pela natureza (Goyer, 1991). É um componente essencial de várias enzimas, das quais se destacam a cobre-zinco superóxido dismutase (Cu-Zn SOD); a citocromo C oxidase, a lisil oxidase, a ferroxidase I (ceruloplasmina), a dopamina beta-hidroxilase e a tirosinase (Gooneratne et al., 1989; Keen e Graham, 1989).

A Cu-Zn SOD está envolvida na conversão do anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Esta enzima, juntamente com as glutathione peroxidases selénio dependentes, constitui um importante sistema de defesa anti-oxidante celular, minimizando as lesões membranares por peroxidação lipídica (Keen e Graham, 1989). A actividade destas enzimas está deprimida nos estados carenciais de cobre.

A citocromo C oxidase constitui o componente terminal da cadeia de transporte de electrões mitocondrial; a redução da actividade desta enzima leva a diminuição da síntese de fosfolípidos, com bloqueio subsequente da síntese de mielina e aparecimento de sintomas nervosos (paralisia espástica, incoordenação motora e cegueira).

A ferroxidase I intervêm no metabolismo do ferro, visto que converte o Fe^{2+} em Fe^{3+} , promovendo a sua incorporação na transferrina, uma proteína que veicula este elemento para os tecidos extra-hepáticos. Por conseguinte, os estados carenciais em cobre, encontram-se muitas vezes associados a anemias por insuficiente formação de hemoglobina (Maas e Smith, 1990). A tirosinase possibilita a conversão da L-tirosina em melanina, um composto responsável pela cor dos tecidos pigmentados. A deficiência em cobre leva a descoloração do pêlo (acromotriquia), por oxidação imperfeita dos grupos tiol livres, durante o processo de crescimento do pêlo (Maas e Smith, 1990).

A deficiência em Cu, particularmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento do animal, mostrou afectar negativamente o sistema imunitário (alterações da função neutrofílica e macrofágica, redução da imunidade humoral e celular, redução da eritropoiese e alterações das subpopulações de linfócitos), diminuindo assim as resistências às infecções bacterianas e às alterações tumorais (Keen e Graham, 1989). A imunodepressão poderá estar relacionada com a diminuição da capacidade de destruição dos microrganismos fagocitados, por redução da actividade da citocromo C oxidase e da Cu Zn SOD (Graham, 1991). Nos bovinos foi registada atrofia das células acinares do pâncreas relacionada com a hipocuprose, podendo ocasionar insuficiência pancreática exócrina, com consequente alteração na eficiência alimentar e nos ganhos de peso (Graham, 1991).

4.1.3 Selénio

O Se é um elemento essencial à vida e o seu efeito benéfico na saúde humana e animal é conhecido há várias décadas (Papp et al., 2007; Lu e Holmgren, 2008; Surai et al., 2008). A deficiência em Se é considerada um importante factor de risco de desenvolvimento de vários processos patológicos em humanos, como o aumento da incidência e da mortalidade por cancro, maior susceptibilidade a infecções, diminuição da função imunitária e da acção da hormona da tiróide, bem como, de doenças neurológicas, cardiovasculares e reprodutivas (Schrauzer, 2001; Beck et al., 2003; Karunasinghe et al., 2004; Papp et al., 2007; Lu e Holmgren, 2008; Surai et al., 2008).

O efeito benéfico do Se na saúde é atribuído a compostos de Se de baixo peso molecular, como o ácido metil-selénico, a metil-cisteína, a seleno-metionina e a selenoproteínas (Papp et al., 2007). O grupo de proteínas que incluem selenocisteína (Sec) como parte integrante da sua cadeia polipeptídica designam-se por selenoproteínas; estas incorporam o Se na forma de Sec por um mecanismo determinado geneticamente, especificado pelo codão UGA no ARN mensageiro (Rayman, 2005). A Sec constitui o 21º ácido aminado, diferindo da cisteína pela presença de um átomo de Se em vez de S (Lu e Holmgren, 2008; Papp et al., 2007). A Sec incorpora as cadeias polipeptídicas fazendo parte do grupo catalítico dentro do local activo das selenoproteínas; em condições de pH fisiológico a Sec é mais reactiva que a cisteína. Os compostos com Se têm maior capacidade redox que os compostos de S, pois são metabolizados para estados mais reduzidos exercendo maior poder antioxidante que os análogos sulfurados (Papp et al., 2007).

Até à actualidade foram identificadas cerca de 25 selenoproteínas nas células eucariotas (Whanger, 2004; Papp et al., 2007). Na Figura 4.2 apresenta-se de forma esquemática o selenoproteoma humano com a classificação funcional das selenoproteínas conhecidas.

As glutathione peroxidases (GPxs) destoxificam o H_2O_2 e os hidroperóxidos derivados dos ácidos gordos, sendo por esta razão designadas por selenoenzimas antioxidantes (Whanger, 2004). As tioredoxinas (TrxRs) e o NADPH constituem o sistema tioredoxina, que é o principal sistema redox celular presente em todos os seres vivos (Papp et al., 2007). As iodo-tironina deiodinases (DIOs) convertem a tiroxina (T_4) em triiodotironina (T_3) e regulam desta forma o metabolismo das hormonas da tiróide (Bianco e Kim, 2006). A selenofosfato sintetase (SPS 2) cataliza a conversão do selenido em selenofosfato, o qual é o dador de Se para a formação da Sec. A selenoproteína P (Sel P) é a segunda selenoproteína mais abundante no plasma a

seguir à GPx3; contem cerca de 50% do Se plasmático; para além de intervir no armazenamento e transporte de Se aos tecidos serve de quelante dos metais pesados e previne a oxidação e a nitratação mediada pelos peroxinitritos. Entre as selenoproteínas envolvidas na configuração tridimensional, funcional, das proteínas, destaca-se a selenoproteína 15 (Sep 15) que participa na regulação da apoptose e na conversão maligna das células tumorais (Papp et al., 2007).

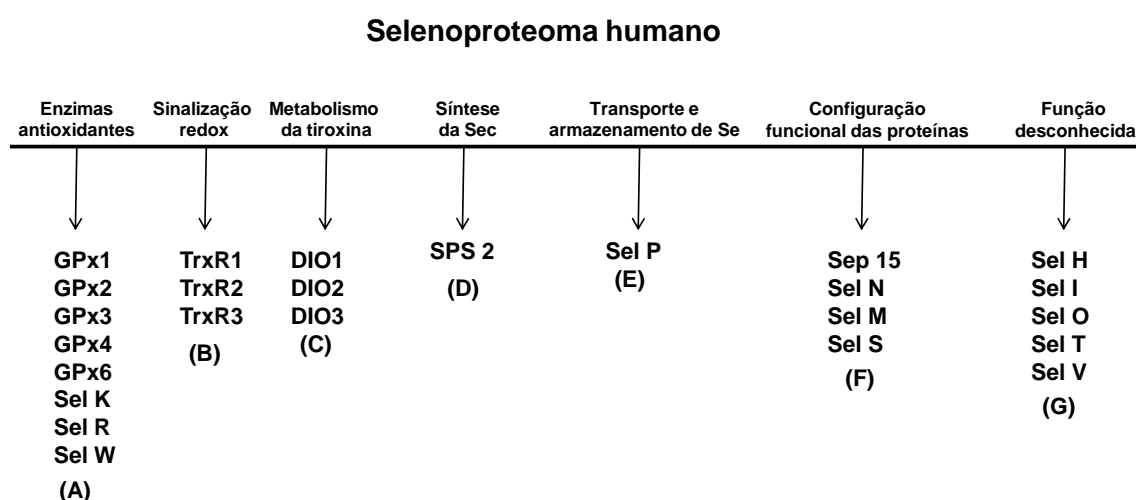


Figura 4.2. Selenoproteoma humano, constituído por 25 selenoproteínas agrupadas de acordo com a sua função, determinada ou potencial, exercida no organismo: (A) antioxidantes, glutathiona peroxidases, GPx1, 2, 3, 4 e 6 e Sel K, Sel R e Sel W; (B) sinalização redox, tioredoxinas, TrxR1, 2 e 3; (C) envolvidas no metabolismo da tiroxina, deiodinases, DIO1, 2 e 3; (D) síntese de selenocisteína (Sec), selenofosfato sintetase 2, SPS 2; (E) transporte e armazenamento de Se, Sel P; (F) configuração funcional, tridimensional, das proteínas celulares, Sep 15, Sel N, Sel M e Sel S; (G) com função desconhecida ou indeterminada, Sel H, Sel I, Sel O, Sel T e Sel V (adaptado de Papp et al., 2007).

4.1.4 Iodo

O iodo (I) é um não-metal, do grupo dos halogéneos (17 ou 7A) na Classificação Periódica dos Elementos. O I é um nutriente essencial, faz parte integrante das hormonas da tiróide: tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). Estas hormonas são essenciais na regulação do metabolismo celular e desempenham um importante papel no desenvolvimento fetal, na imunidade e na reprodução (McDowell, 2003; Azizi, 2009).

Os oceanos constituem a reserva natural de iodo na Terra; muito pouco do iodo do planeta se encontra nos solos (Patrick, 2008). O iodo presente no solo resulta da volatilização do iodo marinho por acção das radiações ultra-violeta da luz solar e do calor (McDowell, 2003; Patrick, 2008). Estima-se que cerca de 400 000 toneladas de iodo se volatilizem dos oceanos para o ar. O iodo atmosférico é seguidamente depositado nos solos e na vegetação por intermédio da água da chuva (McDowell, 2003). O ar da orla marítima pode conter até 400 µg de iodo/m³, enquanto o ar

ambiente normal (afastado da costa) contém 0,74 µg de iodo/m³ (Vought et al., 1970 citado em McDowell, 2003). Por conseguinte, os solos e a vegetação das zonas costeiras contêm naturalmente maior concentração de iodo do que os solos das regiões mais afastadas do mar. O iodo não é necessário ao crescimento das plantas, por isso estas apresentam teores normalmente muito baixos.

As principais anomalias induzidas pelo défice em iodo em humanos apresentam-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Anomalias consecutivas à deficiente ingestão de iodo. Fonte: Knobel e Medeiros-Neto, 2004; Azizi, 2009; Zimmermann, 2009)

Faixa etária	Consequências na saúde
<ul style="list-style-type: none"> Feto 	<ul style="list-style-type: none"> Abortos, nados-mortos, anomalias congénitas, aumento da mortalidade peri-natal, cretinismo endémico
<ul style="list-style-type: none"> Recém-nascidos 	<ul style="list-style-type: none"> Bócio neonatal, hipotiroidismo, atraso mental
<ul style="list-style-type: none"> Crianças e adolescentes 	<ul style="list-style-type: none"> Bócio, alteração da função mental, atraso do desenvolvimento físico, hipertiroidismo induzido pelo iodo
<ul style="list-style-type: none"> Adultos 	<ul style="list-style-type: none"> Bócio, hipotiroidismo e suas complicações, alteração da função mental, hipertiroidismo induzido pelo iodo

Quando não se ingere a quantidade suficiente de iodo diminui a síntese de tiroxina e produz-se um aumento do tamanho da tiróide, conhecido como **bócio**, com hipertrofia da região cervical ventral superior nos bovinos (Fig. 4.3). Diz-se que existe bócio endémico quando o aumento de volume da glândula tiróide afecta mais de 10% dos membros de uma comunidade (Mendes e Zagalo-Cardoso, 2002).

As situações de défice sub-clínico de iodo, sem manifestações de bócio, são muito mais frequentes na população bovina, estas levam a hipoactividade da tiróide com consequentes problemas de infertilidade, animais recém-nascidos débeis, sem pêlo ou nados-mortos (Lebreton e Garnier, 2006).

O conjunto das doenças provocadas por défice em iodo (DDI) constituem uma das doenças deficitárias mais prevalentes a nível mundial, tanto nos humanos como nos animais, visto que ocorre em quase todos os países do mundo (McDowell, 2003; Knobel e Medeiros-Neto, 2004; Azizi, 2009). Segundo informações da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2007 cerca de 2 biliões de pessoas, 30,6% da população mundial, apresentam valores deficitários de iodo urinário (<100 µg/L); estima-se que existam 264 milhões de crianças em idade escolar (31,5%) susceptíveis de sofrer de

DDI (de Besnoit et al., 2008). Os efeitos das DDI apresentam-se na Tab. 4.1. Devido ao facto das DDI atingirem um número tão elevado de pessoas à escala global, o défice de iodo foi considerado uma pandemia silenciosa (Azizi, 2009). Todas as doenças e alterações associadas à carência em iodo são um sério obstáculo ao desenvolvimento social, económico e mental da população de risco, representando um problema de Saúde Pública. (Knobel e Medeiros-Neto, 2004).



Figura 4.3. Vaca com bócio: hipertrofia da região cervical ventral superior. Matadouro de Ponta Delgada, 1995.

Os primeiros estudos de prevalência de bócio realizados em Portugal, remontam à década de 1960 (Mendes e Zagalo-Cardoso, 2002). Uma equipa do Ministério da Saúde concluiu que 43,2% da população do concelho de Oleiros, Castelo Branco, apresentava bócio. Como consequência deste trabalho foi regulamentada a utilização de sal iodado nas regiões onde se diagnosticou bócio endémico: algumas freguesias de Castelo Branco, Proença-a-Nova, Sertão e concelho de Oleiros, através da legislação seguinte: Decreto-Lei nº 49271 de 26.09.1960 e Portaria 338/70 de 4 de Julho.

Mais recentemente, o Professor Sobrinho e a sua equipa do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil diagnosticaram bócio endémico em várias regiões do País (Mendes e Zagalo-Cardoso, 2002). Em 1986, foi realizado o primeiro rastreio nos

Açores, na ISM (Oliveira et al., 1986). Este trabalho abrangeu 4 347 crianças em idade escolar, tendo-se constatado que a prevalência de bócio endémico, nesta população, variava de 11 a 41%. Na zona da ilha mais atingida, freguesia de Sete Cidades, 16% dos homens e 48% das mulheres apresentavam bócio (Oliveira et al., 1986). Este facto poderá dever-se à localização desta freguesia na ISM, dado que se encontra mais afastada da orla marítima que as restantes.

A tomada de consciência pelas autoridades de saúde nacionais de que as DDI têm expressão mais generalizada na população portuguesa, incluindo as regiões do litoral e o arquipélago dos Açores, terá conduzido à regulamentação da liberalização da venda de sal iodado. Neste sentido, foi promulgado o Decreto-Lei nº. 87/96 de 3 Julho do Ministério da Saúde, tendo em vista promover o consumo *per capita* de iodo pela população e actuar como medida profiláctica de múltiplas doenças resultantes de carência neste oligolemento.

O bócio pode ser provocado por substâncias bociogénicas existentes nos alimentos ou na água da bebida, sem haver carência de iodo na dieta (Tab. 4.2).

Tabela 4.2. Substâncias bociogénicas, princípios activos, função e sua origem provável. Fonte: Grace, 1994; McDowell, 2003; Guyot e Rollin, 2007; Eastman e Zimmermann, 2009

Substâncias bociogénicas	Composto	Função	Fontes
Glucósidos cianogénicos (Cianeto de hidrogénio: HCN)	Tiocianato (após metabolização)	Impedem a fixação do I pela tiróide	Trevo branco, grãos de linho, milho-miúdo, batata-doce, mandioca e soja crua
Gluconosilatos	Tiocianatos e goitrina	Impedem a fixação do I pela tiróide;	<i>Brassica spp.</i> : (crucíferas), couve, colza nabos, mostarda
Tiouracilos	Dissulfitos aromáticos	Impedem a conversão da T ₄ em T ₃	Cebola, alho, couve bagaço de colza, mostarda
Compostos inorgânicos	Nitratos, percloratos, iodo em excesso, défice em Se, Ca, Mg, K, Cl, F, Co, Mn, As, Br, Rb	Antagonistas do I, toxicidade para a tiróide, Impedem a conversão da T ₄ em T ₃	Fertilizantes e contaminantes das águas e dos alimentos

O excesso de nitratos (>450 ppm) na dieta de vacas leiteiras diminui a síntese das hormonas da tiróide e da produção de progesterona (Lebreton e Garnier, 2006).

4.1.4 Cobalto

O cobalto (Co) é um metal de transição situado no grupo 9 (8B) da Classificação Periódica dos Elementos. É um nutriente essencial devido ao facto de ser o

componente central da cianocobalamina também designada por vitamina B₁₂ (McDowell, 2003).

A vit. B₁₂ é um co-factor enzimático de três enzimas dos mamíferos: metilmalonil coenzima A mutase, leucina mutase e metionina sintetase (Grace, 1994; McDowell, 2003). A maioria das reacções que envolvem a vit. B₁₂ incluem a transferência ou síntese de unidades de carbono, como por exemplo dos grupos metilo (-CH₃).

A vit. B₁₂ desempenha um importante papel no metabolismo dos ácidos nucleicos e das proteínas: 1. Participa na síntese de purinas e pirimidinas; 2. Transferência de grupos metilo; 3. Formação de proteínas a partir dos ácidos aminados; metabolismo dos glúcidos e lípidos; promove ainda a síntese de eritrócitos e mantém a integridade do sistema nervoso central (McDowell, 2003).

Os sintomas de carência em Co não são específicos e são muitas vezes difíceis de distinguir daqueles relacionados com má-nutrição, por baixa ingestão energética ou proteica, doença ou parasitismo intenso. Os sinais mais relevantes incluem: perda de apetite, alotriofagia, pelagem grosseira, emagrecimento, anemia do tipo normocítico normocrómico e corrimento ocular aquoso. No exame post-mortem pode observar-se má condição corporal associada a fígado gordo (Grace, 1994).

A carência em Co foi identificada em ruminantes em várias áreas do globo, sendo conhecida como “pining”, “salt sick”, “bush sickness” e “wasting disease”; caracteriza-se por emaciação, anemia e letargia (McDonald et al., 1995). Esta doença foi identificada na ISM em meados do século passado sendo conhecida localmente, por *doença da volta* ou *tomadiço* (Barbosa, 1949; Toste, 1953).

O Co em excesso pode provocar danos no ADN por formação do radical •OH, através da reacção de Fenton (Valko et al., 2006). A exposição ao Co tem sido referida como activadora do factor indutor da hipoxia (HIF-1), MAPKs e acumulação da p53. Tem mostrado ainda induzir a formação de ERO e apoptose em diferentes linhas celulares (Franco et al., 2009).

4.2. Material e métodos

4.2.1. Rastreio de oligoelementos na população bovina dos Açores

Tendo em vista a avaliação dos níveis de OE na população de bovinos dos Açores, foram colhidas e analisadas no laboratório do *Nutrition-Biochimie Vétérinaire Consultants* (NBVC), 69570 Dardilly, em França, 481 amostras de sangue de bovino provenientes de 70 explorações de 5 ilhas do arquipélago: 53 de São Miguel, 8 da Terceira, 6 da Graciosa, 2 de Santa Maria e 1 do Corvo. Esta amostragem incluiu predominantemente bovinos da raça Holstein-Friesian (91%), das quais 284 de vacas leiteiras, 129 de novilhas e 13 de vitelos recém-nascidos; as restantes amostras (8,7%) foram obtidas de bovinos da raça Brava (43) e de bovinos de carne da raça Limousine e Charolesa (12).

Foram colhidas cerca de 7 amostras por cada exploração rastreada. Os bovinos seleccionados apresentavam-se clinicamente saudáveis, contudo, os proprietários das explorações de bovinos leiteiros, mencionaram existir na manada problemas de infertilidade, abortos, nados-mortos, mortalidade peri-natal elevada, HEB e IAF (Fig. 4.4.).



Figura 4.4. (A) Vaca com acromotriquia pertencente a exploração com inúmeros casos de hematúria enzoótica, Capelas, Out/2004; (B) novilha com acromotriquia e depressão do estado geral por intoxicação aguda pelo feto comum, proveniente de exploração com graves problemas de toxicidade pelo *Pteridium aquilinum*, Ginetes, Mai/2003.

Nos bovinos de raça Brava havia queixas de infertilidade, elevada mortalidade em vitelos e fragilidade dos cascos e cornos. As amostras foram obtidas na veia jugular ou

coccícea, com agulhas de 18G, para tubos com heparina de lítio (*Sarstedt*®) e tubos de vácuo para separação de soro (*BD Vacutainer*®) e remetidas para o laboratório do NBVC.

4.2.2. Rastreio de oligoelementos na população de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica

Foi ainda realizado um rastreio de carências em zinco, cobre, selénio, iodo e cobalto em 25 novilhas clinicamente saudáveis provenientes de 4 explorações com casos de hematúria enzoótica e surtos de IAF, cujos resultados foram comparados com um grupo controlo constituído por um conjunto de 33 novilhas com idades semelhantes, pertencentes a 5 explorações sem historial de HEB ou IAF.

4.2.3. Ensaio com oligoelementos no crescimento de novilhos

No seguimento do rastreio efectuado para avaliação das carências em OE, foi realizado um ensaio de crescimento com novilhos da raça Holstein-Friesian, tendo em vista determinar o efeito da suplementação com OE nos principais índices produtivos e parâmetros hematológicos.

Este trabalho foi realizado no PECA (Fig. 4.5 e 4.6), uma estação experimental, pertencente ao Serviço de Desenvolvimento Agrário de S. Miguel (SDASM), localizado no terço central da ISM a 550 m de altitude, na freguesia de Ponta Garça, Vila Franca do Campo.

Todos os bovinos utilizados no ensaio foram criados no PECA desde os 15 a 30 dias de idade. Após o desmame não lhes foi administrado qualquer suplemento alimentar, sendo a sua alimentação exclusivamente baseada na erva em regime de pastoreio.

O ensaio decorreu no período compreendido entre 26 de Junho e 13 de Dezembro de 2004. Foram utilizados 22 bovinos machos com idade média de 382 dias (desvio padrão = 24,72) e com peso médio de 267 kg (desvio padrão = 35,71); foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 11 animais cada: teste e controlo. O grupo teste foi suplementado por via oral, com duas cápsulas intra-ruminais de libertação lenta de OE, *AllTrace*® (Agrimin), cuja composição se encontra na tabela 4.2.

Todos os bovinos do ensaio (teste e controlo) foram agrupados num só lote e submetidos ao mesmo tipo de manejo alimentar: pastoreio livre rotacional limitado por cerca eléctrica; foram desparasitados 3 semanas antes do ensaio e à nona pesagem (127 dias de ensaio), com ivermectina e clorsulon, *Ivomec F*® (Merial).

A avaliação do crescimento foi realizada com pesagens quinzenais durante 155 dias, utilizando uma balança *Cachapuz*[®], (Bilanciai Group).



Figura 4.5. Vista aérea do Posto Experimental de Culturas de Altitude (PECA); composto por 25 Ha de pastagem, distribuídos por 24 parcelas. Fonte: SRAF Parcelário (2008).



Figura 4.6. Aspecto geral das parcelas e dos novilhos incluídos no ensaio de suplementação com oligoelementos no Posto Experimental de Culturas em Altitude (Foto gentilmente cedida por Josilene Seixas)

Tabela 4.3 Composição nutricional das cápsulas intra-ruminais de libertação lenta de oligoelementos, *AllTrace*[®]

Componente activo	Quantidade por cápsula	Dose diária disponível por duas cápsulas, durante 240 dias
• Cobre	16,379 mg	136,5 mg
• Cobalto	236 mg	2,0 mg
• Selénio	251 mg	2,1 mg
• Manganês	8,326 mg	69,4 mg
• Zinco	13,382 mg	111,5 mg
• Iodo	497 mg	4,1 mg
• Vitamina A	549,408 U.I.	4 580,0 U.I.
• Vitamina D3	109,881 U.I.	916,0 U.I.
• Vitamina E	1,099 U. I.	9,0 U.I.

Todos os bovinos utilizados no ensaio foram criados no PECA desde os 15 a 30 dias de idade. Foram alimentados com leite de substituição até ao desmame, que ocorreu por volta dos três meses e com alimento concentrado até aos seis meses de idade. Dos seis aos doze meses de idade foram alimentados em regime de pastoreio rotacional limitado por cerca eléctrica.

No início do ensaio foram seleccionados aleatoriamente 8 animais para avaliação hematológica e 5 para doseamento de oligoelementos. As amostras de sangue para hematologia foram colhidas para tubos de vácuo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) potássico de 2,7 ml, *Monovette*[®] (Starsted) e analisadas no contador automático de células *Hemavet 850*[®] (CDC Technologies). As amostras para doseamento de OE foram colhidas para dois tubos: *Vacurette*[®] 4 ml (Starsted), sendo analisadas no laboratório do NBVC, França.

Os resultados referentes ao peso vivo foram sujeitos a análise de covariância, incluindo medidas repetidas, utilizando o procedimento *Mixed* do *Statistical Analysis System* (SAS). A somas dos quadrados foi fraccionada em covariável, suplementação mineral, número de pesagem, interacção suplementação mineral X número da pesagem e termo de erro. O peso vivo inicial foi usado como covariável e o número de pesagem foi considerado como medida repetida. A estrutura de covariância utilizada foi a “unstructured” (UN) conforme mencionado em Wang e Goonewardene, 2004.

Os dados referentes à hematologia e ao doseamento dos minerais foram sujeitos a análise de covariância, utilizando o procedimento “general linear model” (GLM) do programa SAS. Os dados do início do ensaio foram utilizados como covariável nos respectivos modelos.

4.3. Resultados

4.3.1. Rastreio de oligoelementos na população bovina dos Açores

Os resultados do rastreio em OE na população bovina dos Açores apresentam-se de forma decrescente, segundo a intensidade do défice verificado na população estudada, como se segue: Iodo > Cobalto > Selénio > Cobre > Zinco (Tabelas 4.3 e 4.4).

Os resultados obtidos indicam que mais de 92% dos bovinos estudados apresentaram níveis muito baixos de iodo plasmático, associados a valores de tiroxina (T₄) inferiores ao normal. O Iodo (I) foi o mineral cuja carência revelou ser mais generalizada nas explorações e nas diferentes populações de bovinos estudados. Os resultados obtidos

indicam que mais de 92% dos bovinos apresentaram níveis baixos de iodo plasmático. Todas as explorações, na amostragem realizada, apresentaram pelo menos um bovino com carência em I. Mais de 27% das explorações de vacas leiteiras apresentaram pelo menos um animal com valores de I considerados críticos: <15 µg/L. Cerca de 51% das novilhas HF e um terço dos bovinos de raça Brava apresentaram valores de I inferiores a este limiar.

Os baixos valores de T₄ parecem acompanhar os baixos níveis de I, corroborando a importância deste OE na regulação do metabolismo basal. Os baixos valores de iodo plasmático estavam associados a valores de tiroxina inferiores ao normal, sendo particularmente acentuados na população de vacas leiteiras e nos bovinos de carne (Tab. 4.4). A quase totalidade das explorações apresentou pelo menos um bovino com défice em tiroxina.

Tabela 4.4 Número de bovinos e percentagem de explorações com valores de oligoelementos (OE) e tiroxina inferiores aos valores de referência; GPx = glutathione peroxidase; Vit. B₁₂ = vitamina B₁₂ (cianocobalamina); HF = Holstein-Friesian. ND = não determinado. Considerou-se exploração carenciada toda aquela que revelou, na amostragem realizada, pelo menos um animal com níveis séricos de OE inferiores aos valores de referência: *Nutrition Biochemie Veterinaire Consultants*, 2005.

Parâmetros Bovinos e explorações	Zinco	Cobre	Selénio (GPx)	Iodo	Cobalto (Vit. B₁₂)	Tiroxina (T₄)
• Vacas HF %	104/273 38,1	86/279 30,8	88/282 31,2	183/273 94,1	7/19 36,8	230/276 83,3
• Novilhas HF %	68/129 52,7	93/129 72,1	109/129 84,5	59/61 96,7	22/43 51,2	10/24 41,7
• Vitelos HF %	5/13 38,5	5/13 38,5	13/13 100	12/13 92,3	4/7 57,1	1/5 20
• Raça Brava %	2/36 5,5	11/37 29,7	36/42 85,7	36/36 100	23/43 53,5	ND
• Raça de carne %	4/12 33,3	11/12 91,7	1/12 8,3	12/12 100	9/12 75	10/12 83,3
• Explorações %	41/66 62,1	48/67 71,6	54/66 81,8	61/61 100	11/13 84,6	53/54 98,2

Cerca de 85% das explorações rastreadas (11 em 13), apresentaram pelo menos um bovino com valores deficitários em cobalto (Co). O Co revelou ser o segundo OE, cuja carência está mais generalizada na efectivo bovino dos Açores. Os bovinos de carne, da raça Brava e os animais jovens da raça HF parecem ser os mais atingidos pela

carência em Co. Contudo, os níveis séricos de Vit. B₁₂ foram muito variáveis em todas as populações estudadas.

Cerca de um terço das vacas leiteiras estudadas, mais de 84% das novilhas e 86% dos bovinos de raça Brava, apresentaram valores baixos de glutathione peroxidase (GPx). Os bovinos de raça Brava e as novilhas HF apresentaram valores particularmente baixos de GPx. A população rastreada de bovinos de carne foi a única que apresentou valores normais de GPx.

Tabela 4.5. Valores de oligoelementos (OE) e tiroxina (T₄) na população de bovinos dos Açores; GPx = glutathione peroxidase; Vit. B₁₂ = vitamina B₁₂ (cianocobalamina); HF=Holstein-Friesian; Vit. B₁₂ = vitamina B₁₂ (cianocobalamina); ±SD=Desvio padrão; Valores de referência: *Nutrition Biochemie Veterinaire Consultants*, 2005.

Parâmetros de referência	Zinco 13,6–21 µmol/L	Cobre 11,8–18 µmol/L	Selênio (GPx) 250–600 U/gHb	Iodo >105 µg/L	Cobalto (Vit. B ₁₂) 12–20 ng/mL	Tiroxina (T ₄) 60–85 nmol/L
Bovinos						
• Vacas HF (n)	(273)	(279)	(282)	(183)	(19)	(276)
Média	14,3	13,2	202,8	39,1	21,0	41,7
Mín.–Máx.	4,7–26,4	2,0–22,8	1–807	15–92	5–40,8	2–103
± SD	3,3	3,4	131,5	19,1	12,3	18,8
• Novilhas HF (n)	(129)	(129)	(129)	(61)	(43)	(61)
Média	13,3	9,5	107,8	39,9	21,4	63,2
Mín.–Máx.	7,1–23,4	0–18,8	2–727	2–259	0–90	46–49
± SD	2,7	3,9	137	49,1	24,2	12,9
• Vitelos HF (n)	(13)	(13)	(13)	(13)	(7)	(5)
Média	15,7	14,5	139,8	47,2	11,5	111,3
Mín.–Máx.	10,8–24,7	5,7–24,5	15–242	2–245	0,9–30,9	34–232
± SD	4,5	4,9	74,5	65,6	11,1	75,1
• Raça Brava (n)	(37)	(37)	(42)	(36)	(37)	ND
Média	19,2	13,6	67,1	25,6	15,1	
Mín.–Máx.	10,4–43	3,2–20,9	19–261	<15–53	0–67,6	
± SD	6,0	4,5	58,4	10	15,6	
• Raças de Carne (n)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
Média	14,2	7,7	340	36,1	13,5	49,6
Mín. – Máx.	12,2–18,5	5,5–14,8	139–624	15–69	6,8–40,3	20–84
± SD	1,6	2,4	149	17,9	9,3	16,1

Os bovinos de carne e as novilhas HF revelaram ser muito carenciados em Cu, sendo a segunda carência mais importante registada nesta população, com 91,7% e 72,1% de animais carenciados, respectivamente.

Cerca de 38% das vacas leiteiras apresentaram valores deficitários de zinco (Zn), enquanto nas novilhas HF este valor ascendeu a 52,7%, apresentando estas um valor médio deficitário (Tab. 4.5).

4.3.2. Rastreio de oligoelementos na população de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de hematúria enzoótica

No rastreio de OE realizado na população de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de HEB/Tbx, confirmou-se a existência de carências em selênio, cobre e zinco nas duas populações estudadas (Tab. 4.6). Contudo, nas novilhas das explorações com casos de IAF e HEB/Tbx, os valores médios de glutathione peroxidase (GPx) apresentaram diferenças significativamente inferiores (valor de $P < 0,005$) aos valores obtidos nas novilhas pertencentes a explorações-controlo.

Tabela 4.6 Valores de zinco, cobre, selênio (GPx = glutathione peroxidase), iodo plasmático (IIP) e cobalto (Vitamina B₁₂) em bovinos de explorações com e sem problemas de intoxicação aguda pelo feto comum e/ou hematúria enzoótica (controles); \pm SD = Desvio padrão; ND = não determinado *n = 10; ** Fonte: NBV Consultants 2005.

Parâmetros	Problema (n=25) Média Mín-Máx \pm SD	Controlos (n=33) Média Mín-Máx \pm SD	Valores de referência** Mín-Máx	Valor de p
Zinco (μ mol/L)	13,9 7,9-17,1 2,5	14,6 9,8-19,8 2,3	13,6-21,0	0,239
Cobre (μ mol/L)	7,8 2,4-14,5 3,4	9,4 3,1-18,8 4,2	11,8-18,0	0,125
GPx (Selênio) (U/gHb)	44,0 12-199 36,3	172 26-461 138,6	155-600	<0,001
IIP (iodo) (μ g/L)	3,3* 1-12 3,6	ND	> 105	ND
Vit. B₁₂ (Cobalto) (ng/ml)	39,8* 3,6 - 89,2 37,9	ND	12 - 20	ND

Os valores médios de vitamina B₁₂ (indicadora do estado nutricional em cobalto), nas novilhas estudadas, situaram-se dentro do intervalo de referência. Contudo, cerca de 40% das novilhas apresentaram-se carenciadas. Os valores de iodo inorgânico plasmático (IIP) em 10 novilhas de *explorações-problema* foram muito inferiores aos valores de referência (Tab. 4.5).

4.3.3. Resultados do ensaio com oligoelementos no crescimento de novilhos

Os efeitos da suplementação com OE na evolução temporal do peso vivo dos novilhos encontram-se expressos na tabela. 4.7.

Tabela 4.7. Efeito da suplementação com oligoelementos e do nº de pesagens no peso vivo de novilhos em pastoreio. EPM = erro padrão da média

Tempo (dias)	Dieta		EPM
	Controlo	2 cápsulas AllTrace®	
1 (15)	288	291	1, 3
2 (29)	304	321	2,6
3 (43)	310	329	2,3
4 (57)	327	359	3,8
5 (71)	341	380	5,7
6 (85)	340	390	6,5
7 (99)	345	406	8,5
8 (113)	350	424	8,5
9 (127)	345	419	8,5
10 (141)	362	446	9,8
11 (155)	375	459	10,6
Efeitos		Valor de p	
Suplementação mineral		<0,001	
Tempo		<0,001	
Suplementação X Tempo		<0,01	

Tabela 4.8 Cálculo do ganho médio diário (GMD) e do ganho líquido em euros (€) por cada bovino suplementado, durante o período de 155 dias

Variáveis	Suplementados	Controlos
A. Peso vivo inicial (kg)	291	288
B. Peso vivo final (kg)	459	375
C. Diferença = (B-A)	168	87
D. Duração do ensaio	155 dias	155 dias
E. GMD: $E=C/D$ (kg)	$168/155= 1,084$	$87/155= 0,561$
F. Diferença de GMD (kg)	+0,523	
G. Preço do kg de peso vivo	1,1 €	1,1 €
H. Custo do suplemento OE	8 € por bovino	
I. Ganho líquido (GL)= $(FxGxD)-H$ GL= $(0,523 \times 1,1 \times 155)-8$	+81,17 € por bovino	

Os resultados obtidos no ensaio revelaram crescimentos significativamente superiores no grupo de bovinos suplementados com OE (Gráf. 4.1).

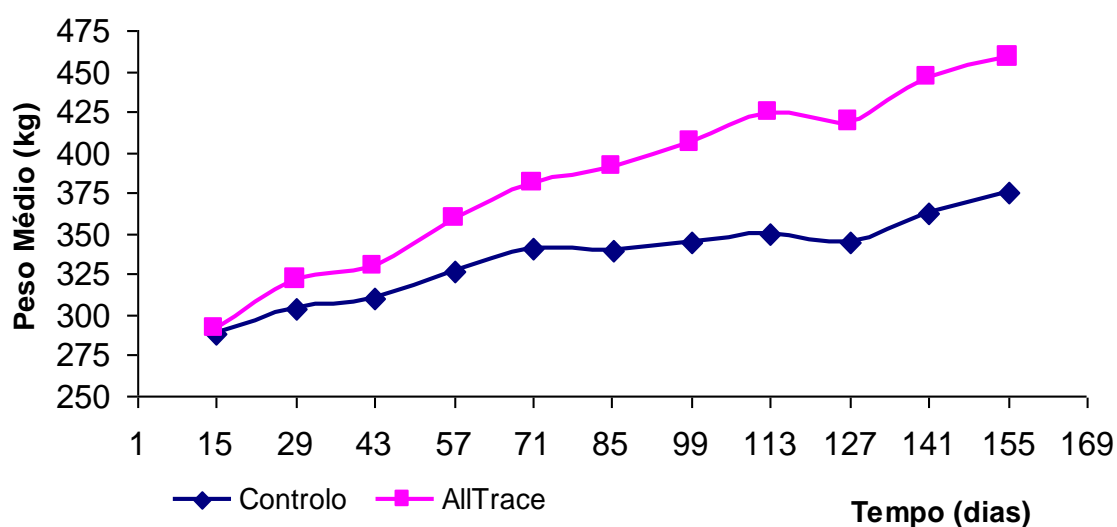


Gráfico 4.1. Evolução dos pesos médios do grupo de 11 novilhos controlo e do grupo de 11 suplementados com oligoelementos na forma de cápsulas intra-ruminais de libertação lenta

As diferenças em termos de condição corporal e pelagem foram evidentes entre os bovinos do grupo teste e controlo (Fig. 4.7).

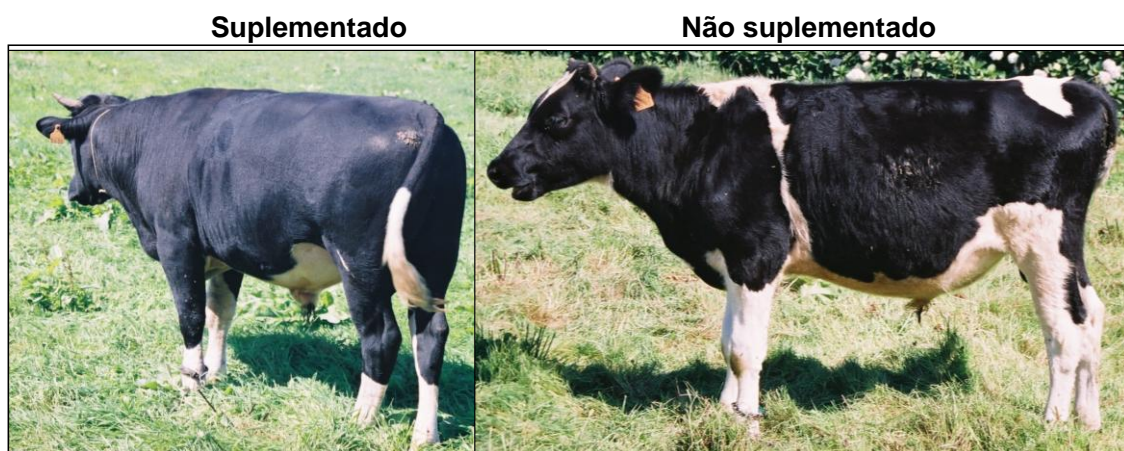


Figura 4.7. São notórias as diferenças no desenvolvimento das massas musculares e no aspecto da pelagem entre bovinos com e sem suplementação com oligoelementos na forma de cápsulas intra-ruminais de libertação lenta. PECA, Out/2005.

Observações do comportamento alimentar dos novilhos integrados no ensaio com OE permitiram verificar maior tendência para herbivoria nos bovinos do grupo controle (Fig. 4.8).



Figura 4.8. Comportamento alimentar dos novilhos: o animal da direita, não suplementado com oligoelementos, foi observado a consumir plantas infestantes na sebe divisória da pastagem. E se existisse feto comum?

Na tabela 4.9 encontram-se os principais parâmetros hematológicos obtidos no final do ensaio nos dois subgrupos, com e sem suplementação mineral em OE na forma de cápsulas intra-ruminais de liberação lenta.

Na tabela 4.10 apresentam-se os resultados comparativos (teste versus controle) do doseamento de OE no final do ensaio.

Tabela 4.9 Comparação entre os principais parâmetros hematológicos avaliados no final do ensaio nos dois subgrupos de animais: controlo (não suplementado) e suplementado com duas cápsulas intra-ruminais de *AllTrace*; *Valores estatisticamente significativos.

Parâmetros Hematológicos	<i>Dieta</i>		Valor de p	Valores de Referência (média)
	Controlo	2 cápsulas AllTrace®		
• Leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	8,97	13,97	0,010*	4,0–12,0 (8)
• Eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	6,68	7,58	0,001*	5,0–10,0 (7)
• Hemoglobina (g dL ⁻¹)	8,09	8,98	0,053	8,0–15,0 (11)
• Hematócrito (%)	24,79	28,35	0,006*	24–46 (35)
• MCV (fL)	37,34	36,37	0,980	40-60 (52)
• MCHC (%)	32,29	31,99	0,750	30-36 (32,7)
• Plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	383,6	434,2	0,470	100-800 (500)

Tabela 4.10. Valores de oligoelementos nos dois grupos de novilhos no final do ensaio

Oligoelementos	<i>Dieta</i>		Valor de p	Valores de Referência (média)
	Controlo (\pm SD)	2 cápsulas AllTrace® (\pm SD)		
• Zinco ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	11,86 (0,893)	15,92 (1,015)	0,03	13,6–21
• Cobre ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	16,61 (1,885)	18,45 (2,117)	0,55	11,8–18,0
• Iodo plasmático (μL^{-1})	3,46 (1,180)	4,18 (1,323)	0,70	>105
• Cobalto (Vit. B₁₂) (n L ⁻¹)	10,06 (4,165)	15,49 (4,658)	0,38	12–20
• Selénio (Gpx) (U gHg ⁻¹)	55,93 (18,180)	86,58 (20,40)	0,31	250-600

4.4. Discussão

Os bovinos dos Açores, à semelhança do que ocorre em outras regiões do Globo como a Nova Zelândia, a Austrália e a Escócia (Grace, 1994), são naturalmente carenciados em alguns OE como o zinco, cobre, selénio, cobalto e iodo. Deve-se este facto à forma como são explorados em sistemas de pastoreio permanente em solos de origem vulcânica. São particularmente deficitários os bovinos em pastoreio das faixas etárias mais jovens, devido à ausência de suplementação mineral na maioria das explorações da ISM (Pinto et al., 2001, 2004).

No rastreio de carências em OE salienta-se o défice generalizado de iodo plasmático nos bovinos da quase totalidade das 70 explorações rastreadas, algumas das quais com valores críticos de iodo $<15 \mu\text{g L}^{-1}$, compatíveis com hipotireoidismo. Os baixos valores de T_4 doseados nas vacas leiteiras corroboram esta possibilidade. Este facto pode justificar o aparecimento nas manadas de problemas de infertilidade, baixas de produtividade, elevada mortalidade peri-natal e fraco crescimento das novilhas; o investimento que tem vindo a ser feito em melhoramento genético dos efectivos poderá não ter retorno, porque os bovinos não podem, nas condições de carência observadas, exibir todo o seu potencial produtivo.

O excesso de nitratos nas pastagens, o défice em Se, o excesso de minerais no solo como o cálcio, potássio, flúor, arsénio e rubídio, bem como a presença de substâncias biogénicas nas forragens podem justificar a deficiente absorção de iodo no tubo digestivo, bem como a captação deste elemento pela tiróide (Corah e Ives, 1991; Guyot e Rollin, 2007). Foram doseados níveis elevados de nitratos nas pastagens e forragens produzidas na ISM, os quais levam ao aparecimento frequente de surtos de intoxicação aguda por nitratos (Pinto e Lobo, 2000; Pinto et al., 2003). A intoxicação dos bovinos por nitratos ocorre predominantemente no Outono, nas pastagens de baixa altitude ($<200 \text{ m}$) onde foram produzidas culturas forrageiras fortemente adubadas com fertilizantes azotados. São especialmente gravosos os anos em que se verifica baixa pluviosidade na Primavera e Verão, que impossibilita a solubilização dos adubos no solo e a sua absorção pela planta. No Outono verifica-se geralmente forte pluviosidade e temperaturas do ar muito favoráveis ao crescimento forrageiro. Por conseguinte, a assimilação dos nitratos pela planta é facilitada nestas condições, o que leva a teores de nitratos na erva superiores ao limiar de toxicidade para bovinos: 5 g por kg de MS (Marais, 1997). O recurso generalizado por parte dos produtores à utilização de adubos à base de azoto, potássio e fósforo, desprovidos de qualquer OE, leva à exaustão dos solos nestes nutrientes com consequências muito negativas na produção bovina e mesmo na cadeia alimentar (Guyot et al., 2009). As práticas

recentes de fertilização dos solos tem conduzido à diminuição do teor de OE nos solos e nas forragens em vários países europeus (Underwood e Suttle a, e b, 1999; Guyot et al., 2009). Os poucos dados existentes sobre teor de selénio nos solos e nas forragens produzidas nos Açores indicam que estas contêm apenas quantidades vestigiais, não mensuráveis, deste OE (Projecto Gado Bravo, 2006, dados não publicados). Os solos com terra castanho-escura desenvolvidos sob a influência de temperaturas moderadas e em condições húmidas são muito pobres em selénio (Tan et al., 2001; Surai et al., 2008). Acresce ainda que a biodisponibilidade do selénio para absorção pela planta depende mais da sua forma química do que da sua concentração total (Surai et al., 2008). No caso de solos ácidos e com pouco arejamento, como se verifica em muitas pastagens localizadas em altitude nos Açores, formam-se compostos insolúveis de selénio com o hidróxido de ferro, tornando-se indisponíveis para as plantas; adicionalmente, solos ricos em sulfato impedem a captação de selénio pelas plantas (Surai et al., 2008). O selénio é normalmente lixiviado das camadas superiores do solo nas áreas de elevada pluviosidade e, conseqüentemente, as forragens aí produzidas apresentam baixos teores deste OE (Tan et al., 2001; Surai et al., 2008). Constatou-se neste estudo que mais de 80% das explorações rastreadas apresentavam valores deficitários de GPx nos bovinos. As carências foram mais acentuadas na população de vitelos HF (100%), gado bravo (85,7%) e novilhas HF (84,5%), que nas vacas leiteiras (31,2%), como se pode ver na Tab. 4.3. É sabido que o grupo das vacas leiteiras é normalmente suplementado com alimentos concentrados durante o período de ordenha (Cap. 2). Estes suplementos alimentares, designados por rações, ou alimentos compostos complementares, incorporam uma pré-mistura com vários OE, vitaminas e outros aditivos, justificando, por esta razão, as diferenças encontradas nos valores de GPx.

Todos os factores acima mencionados, associados a níveis elevados de flúor nas águas de abastecimento público (Lobo, 1994), as quais servem de abeberamento aos bovinos da maioria das explorações justificam os baixos valores de iodo plasmático observados nos bovinos do arquipélago dos Açores. O défice em iodo é agravado nos períodos do ano em que se regista baixa pluviosidade, visto que a água da chuva transporta consigo iodo proveniente do oceano e poderá minimizar as carências neste importante OE (McDowell, 2003).

O selénio é um componente de várias proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade genómica (Karunasinhge et al., 2004), sendo a GPx uma enzima-chave na vigilância do stresse oxidativo. É assumido, mas não demonstrado, que os níveis

de GPx são um bom indicador da produção de outras seleno-enzimas. O selénio, através das várias selenoproteínas e a compostos de selénio de baixo peso molecular, tem sido apontado como tendo efeitos anti-cancerígenos através de vários mecanismos: (1) acção antioxidante, a qual reduz o dano no ADN provocado pelos radicais livres, (2) modulação das enzimas de resposta aos xenobióticos envolvidos no metabolismo dos carcinogénios, bem como através da (3) inibição da resposta inflamatória, (4) estimulação da apoptose, (5) indução da paragem do ciclo celular, (6) activação da p53, (7) indução dos genes reparadores do ADN, (8) estimulação das funções imunitárias e influência na expressão dos receptores estrogénicos e androgénicos (Karunasinhge et al., 2004; Papp et al., 2007). A selenoproteína P tem o potencial de se ligar a metais pesados, como o cádmio, mercúrio e chumbo, conferindo protecção contra a sua toxicidade (Underwood e Suttle, 1999b).

A carência em cobalto, avaliada pelos teores sanguíneos de vitamina B₁₂, afectou 84,6% das explorações rastreadas, tendo sido particularmente prevalente nos bovinos em crescimento (novilhas HF), nos bovinos de carne e no gado bravo (Tab. 4.3). Registou-se, contudo, uma grande variabilidade nos resultados obtidos (Tab. 4.4). As concentrações sanguíneas de vitamina B₁₂ reflectem a ingestão de cobalto na dieta dos ruminantes (Grace, 1994).

Mais de 70% das explorações rastreadas revelaram carências em cobre. Registaram-se valores mais deprimidos na população de novilhas HF e nos bovinos de carne (Tab. 4.3 4.4). As carências em cobre foram confirmadas nos dois grupos de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de HEB e/ou IAF. Este facto pode justificar os baixos valores de hemoglobina e a microcitose observados nesta população. O cobre é importante para o adequado desenvolvimento neuro-muscular dos bovinos em crescimento. O seu défice pode contribuir para a diminuição das defesas antioxidantes por prejudicar o funcionamento da Cu-Zn SOD (Fig. 6).

Cerca de 60% das explorações rastreadas apresentaram pelo menos um bovino deficitário em zinco. O grupo mais afectado por esta carência foi, mais uma vez, o das novilhas HF. Como já foi referido o zinco possui inúmeras funções celulares e será de prever que o seu défice tenha implicações no funcionamento adequado da Cu-Zn SOD, contribuindo para aumentar o stresse oxidativo.

Os dados obtidos no rastreio de OE na população bovina em geral, indicam que novilhas HF são um grupo particularmente deficitário em OE e por conseguinte mais vulnerável ao efeito dos xenobióticos, tais como as toxinas do feto comum.

As diferenças significativas observadas nos valores de GPx entre os dois grupos de novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de HEB, sugerem que as carências em selénio possam facilitar o desenvolvimento de processos neoplásicos, como os Tbx, tão comuns na população bovina da ISM. Vários estudos epidemiológicos realizados em humanos apontam a suplementação da dieta com selénio como uma forma de prevenir o aparecimento de alguns cancros, designadamente o cancro da bexiga (Leppert et al., 2005; Rayman, 2005; Brinkman et al., 2006; Amaral et al., 2009).

Os outros parâmetros de OE avaliados foram tendencialmente inferiores no grupo de novilhas pertencentes a explorações com problemas de toxicidade pelo feto comum. Este facto é indicativo de um maneio alimentar menos adequado nestas explorações. Os baixos valores de iodo inorgânico plasmático detectados nas *explorações-problema* podem levar ao hipotireoidismo, com diminuição do metabolismo basal, anemia e consequente atraso no crescimento (Jain, 1993). Nos bovinos estudados os efeitos tóxicos do ptaquilósido podem ser exacerbados pelas carências generalizadas em OE.

Guyot e colaboradores, 2009, reportaram níveis mais baixos de OE em explorações de bovinos com mais problemas sanitários que em explorações “saudáveis”, num estudo de carências em OE realizado na Bélgica. Constataram que nas explorações deficitárias em OE apresentavam risco superior de aparecimento de patologias várias. Concluíram ainda que o investimento em suplementação com OE nos bovinos reduzia o custo da doença, minimizava as perdas de produção relacionadas com mortalidade, gastos em antibioterapia, decréscimo dos ganhos de peso ou de produção de leite e mesmo o trabalho suplementar relacionado com os tratamentos e outros cuidados prestados aos bovinos.

Os resultados do ensaio de suplementação de novinhos com OE realizado no PECA permitiram concluir que o investimento na suplementação mineral teve um retorno de 1 para 10 (Tab. 4.4). Os bovinos suplementados com OE apresentam valores hematológicos mais elevados (Tab. 4.5), indicativos de melhor capacidade de resposta imunitária às infecções e melhores performances produtivas.

Extrapolando os dados obtidos para a generalidade das explorações pecuárias dos Açores, pode prever-se uma melhoria na rentabilidade e sustentabilidade destas, a médio e longo prazo, através da suplementação mineral apropriada.

O trabalho desenvolvido deverá ter continuidade visto que apesar da suplementação com as CIRLL os novilhos permaneciam deficitários em iodo e em selênio no final do ensaio (Tab. 4.6).

Foram, entretanto, realizados outros ensaios de crescimento de novilhos no PECA que reproduziram os resultados obtidos no presente trabalho (Pinto et al., 2008) e estão em desenvolvimento outras experiências tendo em vista a otimização da suplementação com OE nos bovinos nas condições locais de produção.

5. Mapeamento das neoplasias observadas na parede interna da bexiga

5.1 Introdução

Vários estudos anatomohistopatológicos das lesões vesicais observadas nos bovinos com HEB da ISM foram já publicados (Pinto et al., 2001a, 2001b; Carvalho et al., 2006, 2009; Forjaz et al., 2006).

Nestes estudos salienta-se o facto de ter sido identificado um espectro notável de lesões neoplásicas na bexiga de bovinos com HEB, muitas vezes associadas a lesões inflamatórias e pré-neoplásicas presentes simultaneamente no mesmo órgão. É também surpreendente o facto de haver grande similitude morfológica e bioquímica (eventos moleculares) entre os Tbx observados nos bovinos e aqueles identificados nos humanos (Brun et al., 2008; Roperto et al., 2009). Pelas razões apontadas, os Tbx dos bovinos são considerados um bom modelo para estudo do cancro da bexiga e da carcinogénese em geral.

A utilização combinada de técnicas histológicas convencionais com metodologias modernas de mapeamento genómico possibilitou a avaliação sequencial das diferentes etapas da carcinogénese (Chatuverdi et al., 1997; Spiess e Czerniak, 2006). Foram testados marcadores tumorais em amostras de ADN proveniente de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas colhidas na totalidade do órgão obtido por cistectomia radical em humanos portadores de carcinomas invasivos de elevada malignidade (Koss et al., 1974). O mapeamento de lesões como aquelas observadas na mucosa da bexiga possibilita a identificação da sua distribuição e frequência. Algumas destas lesões não são visíveis macroscopicamente pelas técnicas de rotina utilizadas pelos urologistas (Koss, 1979). Esta metodologia possibilita a identificação da extensão do envolvimento do órgão por lesões pré-cancerosas e delinear conclusões para o diagnóstico e terapêutica.

Com o presente trabalho, pretendeu-se determinar quais as áreas da bexiga mais frequentemente afectadas. Como objectivo secundário está a contribuição para o conhecimento das causas possíveis que intervêm na génese dos processos neoplásicos vesicais, através do mapeamento de lesões suspeitas de neoplasia observadas na superfície interna da bexiga de 100 bovinos abatidos no MISM.

5.2 Material e métodos

Foram estudados os aspectos morfológicos das lesões neoplásicas e a sua distribuição na parede interna de 100 bexigas de bovino, seguindo um protocolo previamente estabelecido (ver anexo 3).

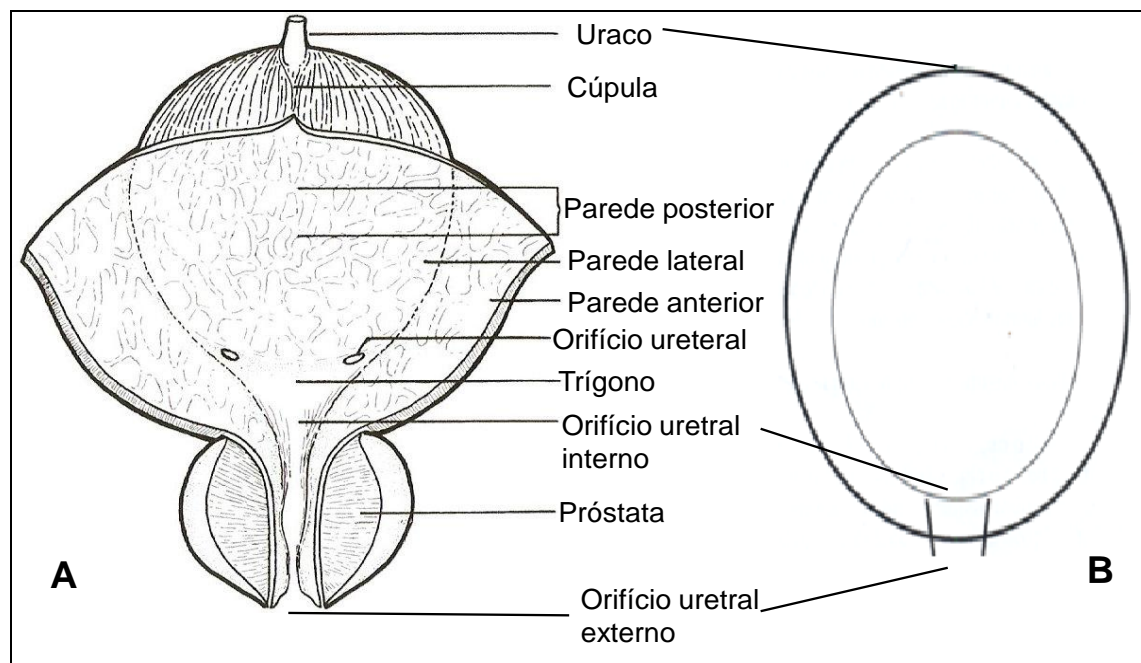


Figura 5.1. (A) Esquema anatômico da bexiga humana masculina, com visualização das estruturas internas após corte sagital. Adaptado de SEER program (2007); (B) Esquema simplificado da bexiga adaptado ao bovino e utilizado no formulário de colheita (ver anexo 3 e Fig. 5.2) para registo das lesões vesicais identificadas na amostra de 100 bexigas incluídas no presente trabalho.

Os procedimentos básicos foram os seguintes: i) Na sequência do exame *post-mortem* de rotina no matadouro, as bexigas com lesões suspeitas de neoplasia foram abertas e esticadas sobre uma placa de corticite com auxílio de alfinetes; ii) o uraco e o orifício uretral foram posicionados e orientados da mesma forma para todas as bexigas (Fig. 5.1, A e B; iii) as lesões neoplásicas macroscópicas observadas na superfície interna de cada uma das bexigas foram desenhadas em folha de papel, seguindo o formulário de colheitas mencionado no Anexo 3 e exemplificado no esquema da Fig. 5.2; iv) avaliou-se o tamanho das lesões e estimou-se o grau de envolvimento lesional do órgão; v) a placa de corticite com a bexiga esticada foi invertida e mergulhada num contentor com formol a 10% em quantidades apropriadas para manter a peça banhada e possibilitar a sua fixação durante 48 horas; vi) após este período colheram-se amostras das lesões neoplásicas de forma a englobar no mesmo fragmento todos os planos da parede da bexiga: mucosa, submucosa, muscular própria e serosa. Os cortes realizados abrangeram, tanto quanto possível, a neoplasia e uma zona

envolvente de parede normal com cerca de 1 centímetro; vii) os fragmentos obtidos foram introduzidos em contentores com formol a 10% e remetidos ao laboratório para análise anatomohistopatológica.

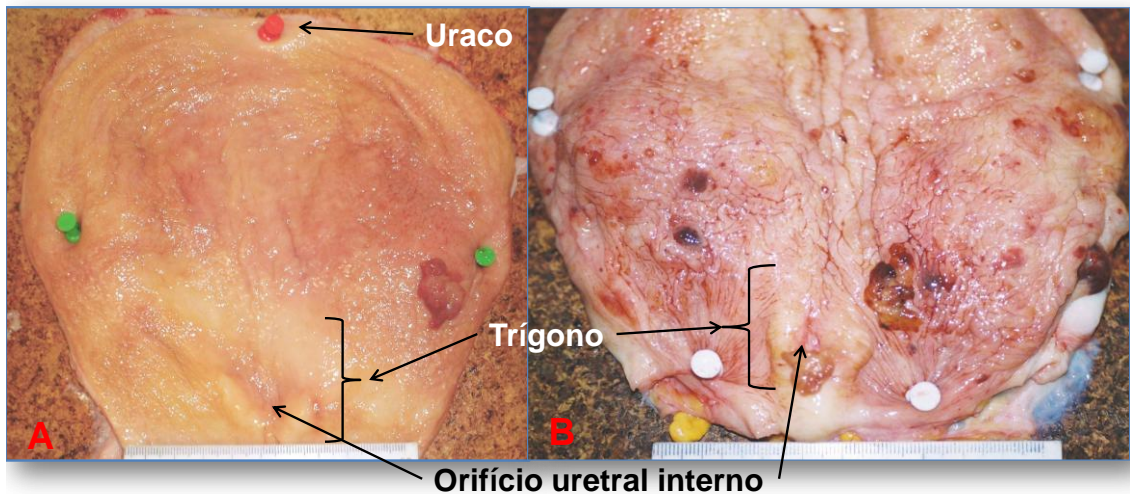


Figura 5.2.. Superfície interna de duas bexigas com tumores; (A) Tumor único exofítico localizado no quadrante ventral direito (equivalente à parede postero-lateral da bexiga de um humano: Figura 5.1; (B) Superfície interna da bexiga com tumores múltiplos; os mais exuberantes localizam-se nas imediações do trígono.

Para cada bexiga observada, foi preenchida uma ficha, na qual se registou os dados de identificação do bovino, o dia e ordem de abate, a descrição macroscópica e o desenho das lesões suspeitas de neoplasia e o número de fragmentos colhidos para histopatologia (Anexo 3). Os resultados das análises histopatológicas completaram a informação contida nestas fichas.

Os dados obtidos a partir do desenho e localização das lesões no interior da bexiga foram transferidos para um suporte informático dos programas *Paint* e *Microsoft Excel* 2003. As lesões vesicais identificadas em cada bexiga foram reproduzidas no programa *Paint* (Fig. 5.3); seguidamente foram quantificadas e distribuídas pelas várias quadrículas de uma folha de cálculo do programa *Microsoft Excel* 2003, utilizando uma escala de 12 cores diferentes, atribuídas a cada quadrícula, conforme ilustrado na legenda da Fig. 5.4. As áreas assinaladas com cores mais escuras correspondem àquelas onde se identificaram maior número de neoplasias.

5.3 Resultados

Este trabalho conduziu à elaboração de um mapa da parede interna da bexiga, contendo toda a informação obtida no desenho e na distribuição das lesões vesicais identificadas nas 100 bexigas estudadas (Fig. 5.3). As áreas mais atingidas são as correspondentes à metade inferior da bexiga, com maior preponderância para o quadrante inferior direito. Em termos anatómicos, são as áreas do trígono e as localizadas nas suas imediações que revelaram maior número de lesões neoplásicas (Fig. 5.2-B e 5.3).

PROJECTO POCTI 34320

Data de Colheita – 6/11/2002
 N° do bovino – 428480/92
 Ordem de abate – 177
 N° no livro de registos – 1483
 Idade – 2 anos e 7 meses
 Observações –

N°	<1cm	1-2cm	2-5cm	5-7cm	7-10cm	>10cm	hemorragia
1		x					x
2		x					x
3/4		x					x

Descrição macroscópica:
 Tumores múltiplos
 1(FOTO): exofítico, pediculado, sup irregular e hemorrágica, envolvida por mancha esverdeada – **A (1)**
 2(FOTO): exofítico, pediculado, sup bosselada e hemorrágica – **B (1)**
 3 e 4(FOTO): exofíticos, sésseis, sup bosselada e hemorrágica – **C (1)**
 Foram colhidos posteriormente mais 4 fragmentos de tumores sem descrição nem foto m

N° da análise – 47/03
 N° de fragmentos para processamento – 7

Descrição microscópica:
 A – Hemangioossarcoma exofítico com extensa necrose associada.
 B – semelhante a A mas é neoplasia independente da primeira.
 C – Hemangioendotelioma com intensa reacção inflamatória e invasão da m.m.; o outro tumor deste corte não foi apanhado na totalidade mas trata-se apenas de uma hiperplasia do estroma.
 1 - Hemangioendotelioma com invasão da m.m..
 2 – CCT T1G2 com degenerescência quística central e necrose da superfície vesical.
 3 – duas neoplasias vasculares distintas, uma mais maligna que a outra (?).
 4 – Hemangioendotelioma.

Figura 5.3. Exemplo de ficha de registo dos dados relativos ao mapeamento das lesões suspeitas de neoplasia, no interior da parede interna da bexiga. Apresentam-se os dados de identificação do bovino, dia e ordem de abate, descrição macro e microscópica das lesões neoplásicas e diagnóstico histopatológico respectivo.

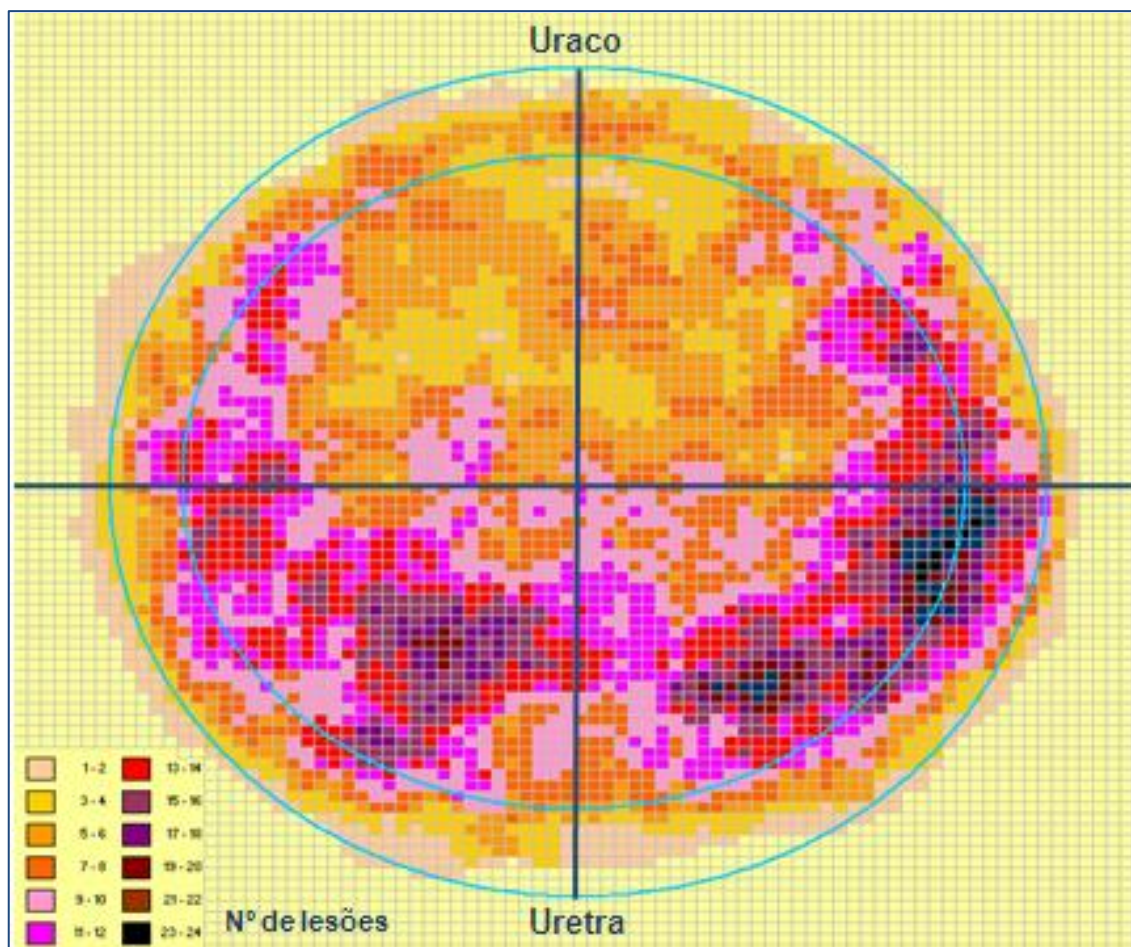


Figura 5.4. Distribuição das lesões neoplásicas macroscópicas observadas na parede interna da bexiga de 100 bovinos abatidos no Matadouro Industrial de São Miguel no período compreendido entre Setembro de 2002 e Janeiro de 2003. As áreas mais atingidas são as correspondentes aos quadrantes inferiores da bexiga, com maior preponderância para o quadrante inferior direito.

5.4 Discussão

Os dados obtidos no mapeamento das lesões neoplásicas revelaram que os quadrantes inferiores da bexiga (Fig. 5.4), tais como as áreas envolventes do trígono - área da mucosa vesical delimitada pelos orifícios ureterais e pelo orifício uretral interno (Fig. 5.2-A e B) - são aquelas que apresentam uma maior incidência tumoral, com preponderância para o quadrante inferior direito. Estas áreas da bexiga localizam-se, nos bovinos, na porção mais ventral do órgão e, como consequência, estão em contacto mais prolongado com a urina. Nos humanos, o urotélio do trígono e suas imediações situam-se na porção inferior da bexiga e por conseguinte, estando, à semelhança dos bovinos, em contacto mais prolongado com a urina (Fig. 5.1-A).

Um dos primeiros estudos humanos a apontar para a importância do local de contacto da urina com o urotélio e posterior desenvolvimento de cancro foi publicado em 1976

por Parkash e Kiesswetter.¹ Contudo, já McDonald e Lund (1954) referem que os tumores vesicais em cães experimentalmente expostos à 2-naftilamina, amina aromática cancerígena para os humanos (Baan et al., 2009), só surgem nas bexigas que contactaram com a urina, não se observando crescimento tumoral nas bexigas restantes (citado em Silverman et al., 2006).² Em 1981, Oyasu et al. apontam o fenómeno de carcinogénese vesical em ratos como estando relacionado com o contacto directo com a urina. Também Kadlubar et al. (1991) demonstraram que o nível de aductos de Adn presentes no urotélio de cães igualmente expostos a uma amina aromática (4-aminobifenil), era tanto menor quanto maior fosse a frequência da micção. Todos estes estudos inclinam-se para o inquestionável efeito da estase urinária, e consequente contacto com compostos presentes na urina, no processo de carcinogénese vesical, quer em humanos quer em animais.

Ozkul e Aydin (1996) também concluíram que 77,2% das lesões tumorais identificadas em 815 bexigas de bovino e de búfalos de água se localizaram nas porções ventrais e laterais do órgão em contacto permanente com a urina. As áreas envolventes ao trígono vesical foram também as mais atingidas por lesões cancerosas e pré-cancerosas num estudo realizado em 100 bexigas de humanos (Koss, 1979). A origem embrionária do trígono vesical poderá também ser um factor adicional para justificar a maior incidência de lesões neoplásicas nesta área do urotélio da bexiga. A bexiga, a uretra e a parte inferior da vagina dos mamíferos derivam do seio urogenital, o qual tem origem endodérmica (Sadler, 2003). O urotélio do trígono tem origem mesodérmica, enquanto o restante urotélio da bexiga é de origem endodérmica. Nos mamíferos adultos o urotélio de origem endodérmica acaba por revestir toda a mucosa vesical, incluindo a área do trígono (Sadler, 2003).

A informação obtida no mapeamento das lesões neoplásicas e inflamatórias na superfície interna da bexiga sugere que o(s) composto(s) carcinogénico(s) envolvido(s) na génese da HEB/Tbx é (são) eliminado(s) pelas vias urinárias e tem (têm) actividade biológica na bexiga. Esta possibilidade enquadra-se no mecanismo de acção do ptaquilósido, cuja eliminação se faz predominantemente pela urina e tem maior actividade biológica nos órgãos com pH alcalino por conversão em dienona (Ojika et al., 1987; Smith, 1997). A superfície interna da bexiga dos bovinos constitui um órgão-alvo para o ptaquilósido, por estar em contacto permanente com urina com pH compreendido entre 6 e 9 (Verlander, 2007).

¹ Resumo (abstract) disponível em <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=ShowAbstract&ArtikelNr=280070&Ausgabe=252100&ProduktNr=224282>, acedido a 22 de Fevereiro de 2010.

² Referência bibliográfica disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13152884>, acedido a 22 de Fevereiro de 2010.

É sabido que os bovinos, em condições normais de pastoreio, passam cerca de dez horas por dia em decúbito esterno-abdominal para repousarem e para ruminarem (Beauchemin, 1991). A micção e consequente esvaziamento da bexiga ocorre predominantemente quando os bovinos interrompem os períodos de repouso para se levantarem. Assim, durante a maior parte do dia a urina vai-se acumulando na bexiga, sendo este órgão distendido e empurrado pelo saco dorsal do rúmen e pelo útero grávido. A disposição anatômica do saco dorsal do rúmen, posicionado sobre a metade esquerda da cavidade abdominal, empurra a bexiga dorsalmente e mais para a direita, justificando a maior incidência de lesões neoplásicas no quadrante inferior direito da bexiga.

6. Papilomavírus e hematúria enzoótica bovina

6.1 Introdução

Os primeiros papilomavírus (PV) animais foram identificados no início do século XX (Majewski e Jablonska, 2009). Em 1933, Shope demonstrou pela primeira vez a etiologia viral das verrugas de ocorrência natural em coelhos silváticos do género *Sylvilagus* (Rous e Kidd, 1940). Foi demonstrado por Rous e Beard, um ano mais tarde, que as verrugas observadas coelhos podem progredir para carcinomas nos coelhos domésticos (Rous e Kidd, 1940). Estas descobertas constituem o primeiro exemplo, na história da medicina, de cancro provocado por um vírus ADN (zur Hausen, 2009; Majewski e Jablonska, 2009). Anos mais tarde foram produzidos fibromas e pólipos na superfície interna da bexiga em 13 de 15 vitelos, através da inoculação de uma suspensão de papilomas cutâneos de bovino (Olson et al., 1959; 1965). Estas formações neoplásicas são similares àquelas de ocorrência natural e, em circunstâncias normais, regredem ao fim de algum tempo. Nas décadas de 1950 e 1960 os PV foram classificados juntamente com os poliomavírus na família dos papovavírus (*Papovaviridae*). Contudo, foram detectadas inúmeras diferenças na estrutura genómica destes vírus como resultado dos estudos moleculares e funcionais desenvolvidos na década de 1980, e que justificaram a sua separação em duas famílias pelo Comité Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV). Os PV foram, assim, agrupados na família dos *Papillomaviridae* (ver Tabela 6.1). Esta família foi ainda subdividida em género, espécie, tipo, subtipo e variantes. O critério de classificação baseou-se na sequenciação de nucleótidos da *open reading frame* (ORF), ou janela aberta de leitura, do gene L1 dos PV (de Villiers et al., 2004).

A designação de PV atribuída a este grupo de vírus deriva da sua capacidade para induzir a formação de tumores benignos na pele e mucosas (Fig. 6.1), designados por papilomas ou verrugas. O termo papiloma indica uma pequena saliência na pele ou mucosa: *papilla* do Latim, mais o sufixo *oma*, que deriva do Grego e significa tumor (Pfister, 1987). A importância crescente dos PV deriva do facto de serem considerados vírus oncogénicos, estando associados à génese de neoplasias malignas na pele e mucosas de diferentes espécies animais, incluindo o Homem (Olson, 1987; IARC, 1995). Nos humanos estes vírus são considerados determinantes na génese do carcinoma do cérvix e de cancros ano-genitais (zur Hausen, 1996; 2002). As infecções persistentes pelos papilomavírus humanos (HPVs) são os principais factores de risco

para o carcinoma do cérvix, representando este a 2ª doença maligna mais frequente na mulher, à escala global (zur Hausen, 2009).



Figura 6.1. Novilhas com lesões exuberantes e persistentes de papilomatose.

Os PV têm genoma de ADN de cadeia dupla, com estrutura circular e tamanho aproximado de 8 kb (de Villiers et al., 2004). O virião do BPV tem uma estrutura icosaédrica sem envelope de 55 a 60 nm de diâmetro; contém uma dupla cadeia de ADN circular interligada com histonas celulares (Campo, 2000; Borzacchiello e Roperto, 2008). Duas proteínas integram a estrutura da cápside L1 e L2, contribuindo, a primeira, para cerca de 90% do virião e, a segunda, para cerca de 10% (Fig.6.2). O genoma dos papilomavírus é composto por três regiões funcionalmente distintas: i) *Long control region* (LCR), ou região de controlo longo, composta pelos genes E1 e E2, que codificam para a produção de proteínas com função de replicação e transcrição viral; ii) região das oncoproteínas E5, E6 e E7, que participam na desregulação do controlo do ciclo celular, possibilitando a transformação maligna das células do hospedeiro (Campo, 1997; zur Hausen, 2002; Borzacchiello e Roperto, 2008) iii) região dos genes L1 e L2, que codifica para a produção das proteínas da

cápside, que assim completa a formação do virião. As ORF dividem-se em genes precoces (E) e genes tardios (L).

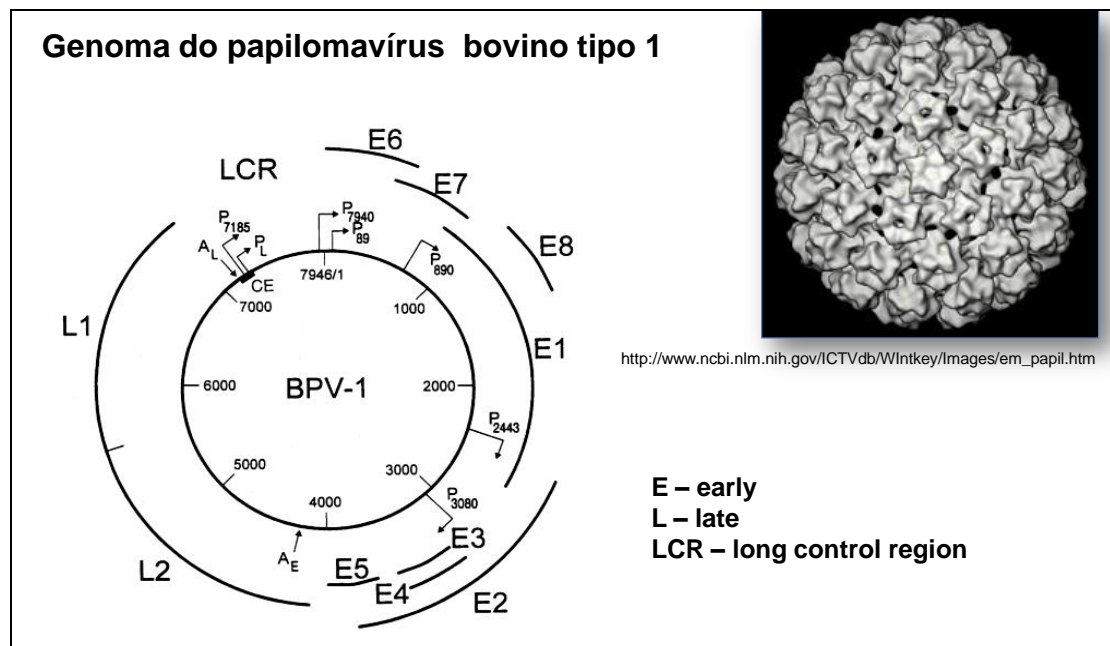


Figura 6.2. Aspecto da cápside proteica de um papilomavírus (canto superior direito). Representação esquemática da organização genómica do BPV-1. O genoma é dividido funcionalmente, por ordem de expressão genómica, em dois grupos de genes - i) *Early genes* ou genes iniciais (E1 a E8), porque são expressos imediatamente após a infecção inicial de uma célula hospedeira, e ii) *Late genes* ou genes tardios (L1 e L2). (Adaptado de Howley e Lowy, 2007).

Até à actualidade foram caracterizados e sequenciados os genomas de mais de 120 tipos diferentes de PV em várias espécies de mamíferos e aves (de Villiers et al., 2004). Cerca de 100 destes PV foram identificados em tecidos de humanos, sendo designados por HPVs. Nos bovinos eram apenas conhecidos 6 tipos de PV: BPV-1 a BPV-6 (Campo, 1997). Recentemente, foram identificados mais 4 tipos: BPV-7 a BPV-10 (Tomita et al., 2007; Claus et al., 2008; Hatama et al., 2008). Os PV constituem um grupo muito heterogéneo de vírus e diferentes genótipos estão associados a diferentes tipos de lesões (Wosiacki et al., 2002; Roperto et al., 2009). A classificação dos diferentes tipos de BPVs baseou-se no seu comportamento biológico, nas características do seu genoma e nos seus antígenos (Tabela 6.1). Apesar do seu pequeno tamanho, a biologia dos PV é muito complexa. O ciclo biológico dos PV está intimamente associado ao processo de diferenciação das células epiteliais: os vírus penetram o epitélio da pele e/ou das mucosas lesadas e infectam os queratinócitos basais, expressando parte dos seus genes nas camadas basais e supra-basais, replicando o seu genoma nas camadas espinhosas e granulosa, em diferenciação.

Os seus genes estruturais são expressos na camada escamosa, onde é formada a cápside que envolve o ADN. Finalmente, os novos vírus são libertados com as escamas de queratina da pele, ou com as células de descamação epitelial nas mucosas, podendo de seguida infectar outras células (Campo, 1997).

Tabela 6.1. Propriedades biológicas e organização genómica por cada género da família *Papillomaviridae*, com relevância para as espécies domésticas. Fontes: de Villiers et al., 2004; Hamata et al., 2007; Borzacchiello e Roperto, 2008; Claus et al., 2008.

Género	Propriedades biológicas	Organização genómica
<ul style="list-style-type: none"> Delta-papilomavírus (BPV-1 e BPV-2) 	Lesões nos ungulados; Induzem fibropapilomas nos bovinos e sarcóides no cavalo; Transmissão inter-espécie possível	As ORFs localizadas na ELR têm capacidade transformadora
<ul style="list-style-type: none"> Epsilon-papilomavírus (BPV-5 e BPV-8) 	Papilomavírus cutâneo dos bovinos Lesões cutâneas nos tetos	
<ul style="list-style-type: none"> Zeta-papilomavírus 	Lesões cutâneas dos cavalos	ORF indefinida e sobreposta com a ORF L2
<ul style="list-style-type: none"> Eta-papilomavírus 	Papilomavírus das aves Lesões cutâneas	E4 e E5 das ORFs ausentes; ORF com características parciais da E6
<ul style="list-style-type: none"> Teta-papilomavírus 	Papilomavírus das aves Lesões cutâneas	ORF da E6 atípica; E7 ORF ancestral com características parciais da E6
<ul style="list-style-type: none"> Iota-papilomavírus 	Papilomavírus dos roedores	Ausência da ORF da E5 ORF da E2 maior que em outros géneros
<ul style="list-style-type: none"> Kapa-papilomavírus 	Isolado em coelhos Lesões cutâneas e nas mucosas	ORF da E6 maior que em outros papilomavírus Aloja uma ORF da E8 não caracterizada dentro da ORF da E6
<ul style="list-style-type: none"> Lambda-papilomavírus 	Papilomavírus animais Lesões cutâneas e nas mucosas benignas	Região ELR muito grande (1500 pb e 1271 pb em duas espécies conhecidas)
<ul style="list-style-type: none"> Xi-papilomavírus (BPV-3, BPV-4; BPV-6; BPV-9 e BPV-10) 	Papilomavírus bovino Induz verdadeiros papilomas no hospedeiro Lesões cutâneas e nas mucosas	Ausência da ORF E6 características ORF E8 (localizada na região ORF E6) com propriedades similares à ORF E5 do BPV-1
<ul style="list-style-type: none"> Pi-papilomavírus 	Isolado de hamsters Lesões nas mucosas	Ausência de ELR com ORF da E2 e L2 parcial/ sobrepostas

Os tumores epiteliais ou fibroepiteliais da pele e mucosas induzidos pelos PV são, em circunstâncias normais, considerados lesões proliferativas benignas, que apresentam crescimento limitado e geralmente regredem espontaneamente sem provocarem qualquer problema clínico sério ao hospedeiro (Campo, 1997). Contudo, em determinadas circunstâncias, as infecções persistentes provocadas pelos PV associadas a imunodepressão do hospedeiro e a co-factores ambientais, como as toxinas do feto comum (Figura 6.3), poderão facilitar a transformação do papiloma e a sua progressão para carcinoma (Roperto et al., 2009).



Figura 6.3. Papilomas múltiplos, exuberantes e persistentes localizados no lábio inferior, focinho e na extremidade do membro anterior direito de uma vaca com 9 anos de idade pertencente a uma exploração onde se registaram casos de hematúria enzoótica. Evidencia-se a presença abundante de *P. aquilinum* na periferia da pastagem (Faial da Terra, Jul/01).

O estudo das interacções entre os BPVs e os carcinogénios do feto comum constituem um modelo para a investigação do cancro nos humanos. Na figura 6.4 apresenta-se, de forma esquemática, um exemplo do sinergismo de actuação entre os BPVs e as toxinas do feto comum na génese dos Tbx dos bovinos.

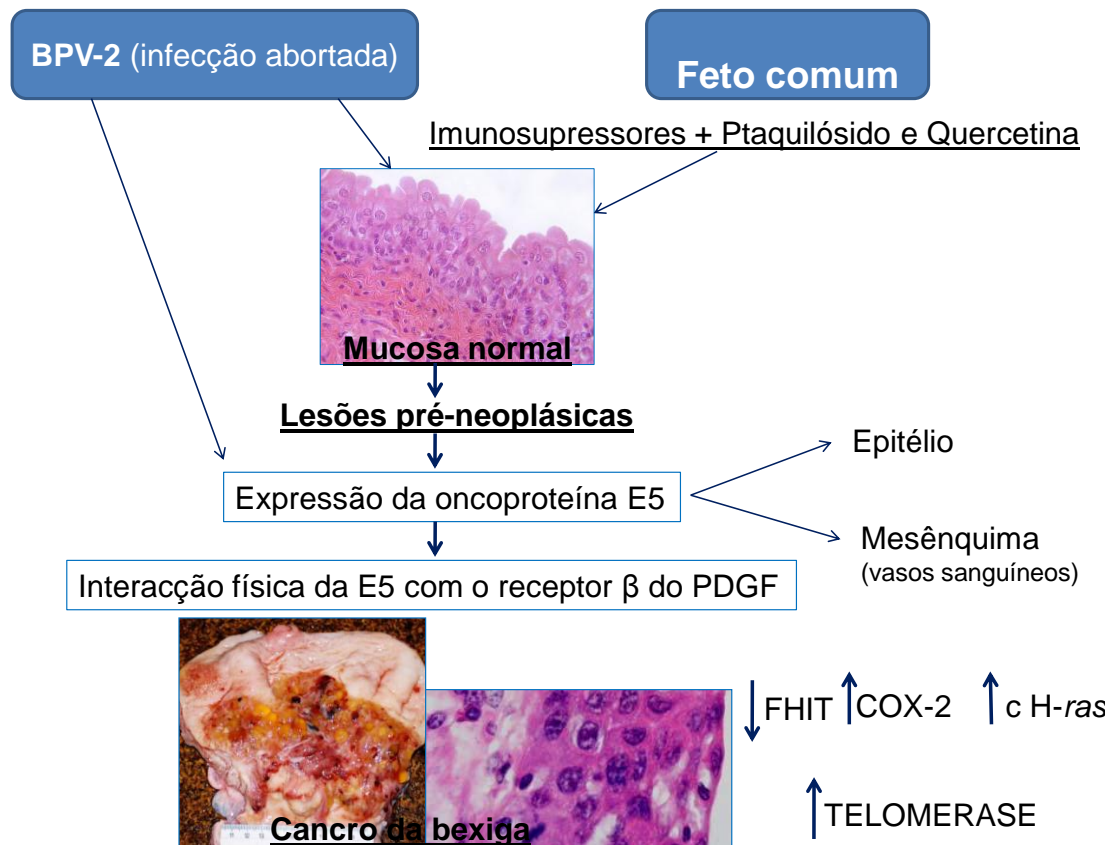


Figura 6.4. Representação esquemática dos eventos que conduzem à génese dos tumores de bexiga (Tbx) induzidos pelos BPV-2 em sinergia com as toxinas do feto comum, em bovinos que pastoreiam em áreas infestadas pelo *Pteridium spp.*; os tóxicos do feto comum actuam de forma sinérgica com os vírus, despoletando a expressão dos oncogenes virais E5 e E7. Os eventos celulares ligados à génese dos Tbx associados ao BPV-2 incluem a ligação da E5 com a forma activada do receptor β do *platelet derived growth factor* (PDGF), o aumento da expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), do c H-ras e da telomerase, com inibição da *fragile histidine tetrads* (FHIT). Adaptado de Borzacchiello e Roperto (2008).

A persistência das infecções virais pelos PV é considerada um factor de risco para a progressão neoplásica. Os períodos de latência destas infecções podem variar de 1 até 40 anos no Homem (Pfister, 1987). Foram identificados alguns co-factores externos que induzem a progressão para tumores malignos nos bovinos (Tabela 6.2) e que reduzem o período de latência, tais como: carcinogénios químicos, radiações ultra-violeta, raios X, (Pfister, 1987) administração de agentes imunossupressores como a azatioprina (Campo et al., 1992). O desenvolvimento de tumores malignos é também

significativamente influenciado pela predisposição genética do hospedeiro (Pfister, 1987).

Entre os BPVs conhecidos, apenas o BPV-1 e o BPV-2 infectam o urotélio da bexiga (Roperto et al., 2009). Tem sido detectado ADN viral, principalmente do BPV-2, no urotélio de bexigas saudáveis, o que sugere fortemente a existência de infecções latentes sub-clínicas. A presença de BPV na bexiga deve-se provavelmente a infecções secundárias oriundas das áreas para-genitais e/ou disseminação via colostro (Roperto et al., 2008). É também possível a transmissão vertical dos BPVs no momento do parto (Santos et al., 1998). Nos hospedeiros imuno-comprometidos, tais como os bovinos que pastoreiam em áreas infestadas pelo feito comum, os BPVs não são eliminados e as infecções latentes podem ser reactivadas, dando lugar ao aparecimento de doenças debilitantes, incluindo os Tbx (Roperto et al., 2009).

Tanto os vírus como o próprio ADN viral dos BPV-1 e BPV-2 são capazes de transformar os fibroblastos bovinos ou as células epiteliais até à completa oncogenicidade (Campo et al., 1990; Campo, 2000). Esta propriedade é função da expressão das oncoproteínas E5, E6 e E7 (zur Hausen, 2002; 2009).

A E5 é um polipeptídeo hidrofóbico com 44 ácidos aminados no BPV-1 e é considerada a principal oncoproteína dos BPVs; é expressa nas camadas profundas do epitélio e localiza-se nas membranas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi das células do hospedeiro (Ashrafi et al., 2002; Borzacchiello et al., 2003, 2006; Roperto et al., 2009). Esta proteína pode ser expressa nas células neoplásicas de origem epitelial como nas de origem mesenquimatosa (Borzacchiello e Roperto, 2008). A E5 interage com a subunidade 16KDa da proteína C, a qual é um componente da bomba H^+ -ATPase. Esta bomba é crítica para o funcionamento dos compartimentos celulares designadamente: i) provoca acidificação dos compartimentos endomembranares e prejudica as comunicações intercelulares das “gap-junctions”, perturbando a homeostasia celular; ii) diminui a expressão do “major histocompatibility complex” classe 1, (MCH-1), o que implica um mecanismo pelo qual o BPV se evade à resposta imunitária do hospedeiro; iii) interferência com o processamento dos factores de crescimento (Ashrafi et al., 2002; Borzacchiello et al., 2006; Borzacchiello e Roperto, 2008). Foi ainda demonstrado que a ligação física da E5 à subunidade β do receptor do *platelet derived growth factor* (PDGF) é a primeira etapa da carcinogénese urotelial espontânea (Fig. 6.4). Como consequência da expressão do receptor β do PDGF desencadeia-se uma reacção em cascata, com activação da PI3-k-Akt da via da

ciclina D3 e outras cinases, com fosforilação do p-Akt, p-Jun e p-JNK nos tecidos neoplásicos (zur Hausen, 2002; Corteggio et al., 2009).

As oncoproteínas E6 e E7 são consistentemente expressas nos tecidos malignos (zur Hausen, 2002); são capazes, de forma independente, de imortalizar vários tipos de células humanas em culturas de tecidos e actua de forma sinérgica na transformação maligna das células do hospedeiro; a E6 interage com a p53 e a E7 com o gene do retinoblastoma (RB), bloqueando a sua actividade de genes supressores tumorais (zur Hausen, 2002). A E6 promove a degradação da p53 e da proteína pró-apoptótica BAK, resultando em aumento da resistência à apoptose e instabilidade cromossómica.

Tabela 6.2. Tumores malignos dos bovinos associados a infecções por papilomavírus

Tipo de Vírus	Tumor	Período de latência	Factores oncogénicos	Referências
• BPV-4	Carcinoma Tracto Dig. Sup.	< de 1 ano	Toxinas do feto comum	Pfister, 1987; Campo, 2000
• BPV-2	Neoplasias da bexiga	> de 550 dias	Toxinas do feto comum	Pamucku et al., 1967; Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003; Resendes et al., 2010

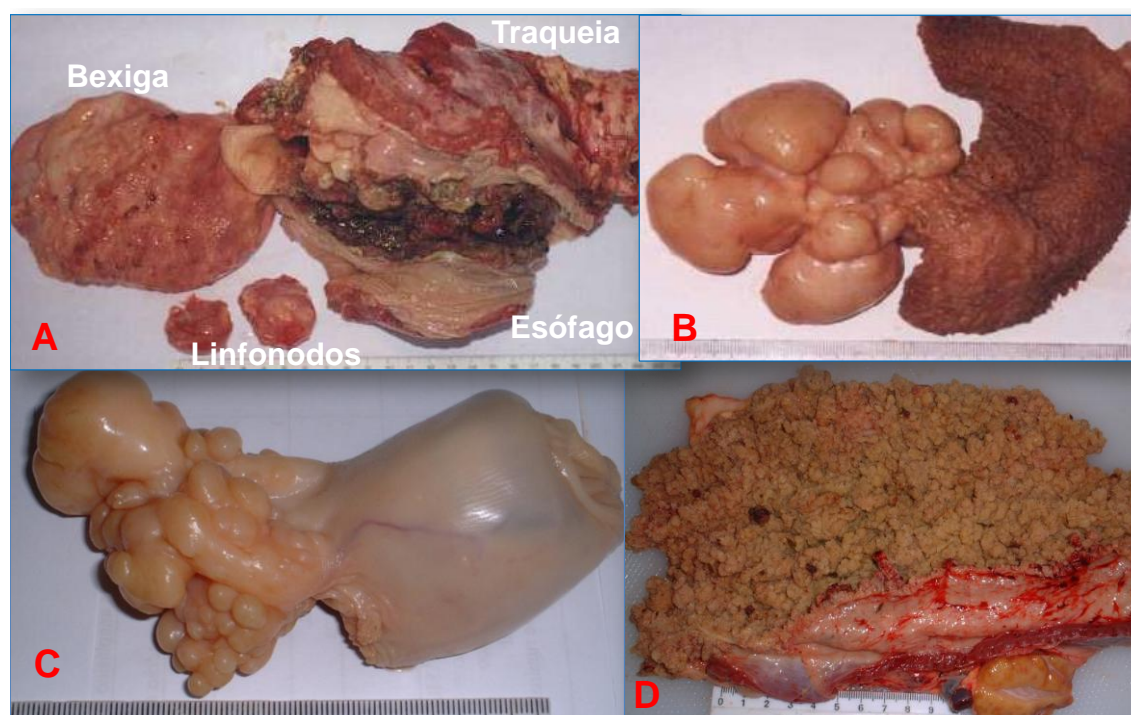


Figura 6.5. (A) Carcinoma da faringe e do esófago de bovino, com hipertrofia dos linfonodos retrofaríngeos. Salienta-se a presença simultânea de lesões neoplásicas na mucosa da bexiga; estas amostras foram colhidas de uma vaca leiteira proveniente de uma exploração que apresentava graves problemas de hematúria enzoótica (Ginetes, Jul/1999). (B) Tumor exofítico exuberante localizado no rúmen; (C) Tumor exofítico do esófago; (D) Papiloma exuberante preenchendo o lume esofágico de bovino.

O gene E7 do BPV-1 codifica para uma proteína com 127 ácidos aminados ligada a zinco e que coopera com a E5 e a E6 na transformação celular. A E7 é co-expressa com a E5 e a E6, aumentando muito a capacidade transformante promovida pelos BPVs (Borzacchiello e Roperto, 2008). A BPV-E7 pode inibir a *anoikose*, que é uma forma específica de apoptose, devida a um defeito de ligação entre a célula e a matriz extracelular (Frish e Francis, 1994; Grossmann, 2002). Ocorre *anoikose* quando as integrinas da célula não se ligam mais às proteínas da matriz enviando um sinal de morte celular. A E7 estimula os genes da fase-S e parece bloquear a função dos inibidores das cinases WAF1 (também conhecida por CIP1 e p21) e KIP1 (também conhecida por p27); induz aneuploidia e contribui para a tumorigénese (zur Hausen, 2002).

O objectivo do estudo dos “Papilomavírus e sua relação com a hematúria enzoótica”, foi: i) actualização dos conhecimentos sobre a possível relação entre os BPV e a génese da HEB; ii) identificação de ADN viral dos BPV-2 em amostras de bexigas com e sem lesões neoplásicas.

6.2 Material e métodos

Foram colhidas 300 amostras de bexiga, das quais 200 apresentavam lesões neoplásicas na superfície interna da bexiga e 100 (controlos) sem qualquer manifestação lesional visível. Foram utilizadas pinças esterilizadas e uma lâmina de bisturi nova para cada bexiga. Os fragmentos colhidos pesavam cerca de 100 mg, foram revestidos por papel de alumínio, identificados e conservados em azoto líquido.

A extracção do ADN do BPV-2 foi realizada com recurso a um kit da QIAGEN “QIAamp® DNA Mini Kit”, de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do ADN extraído foi avaliada através das medições das absorvâncias 260 e a 280 nm.

Para evitar contaminações cruzadas, as amostras com e sem lesões foram colhidas e processadas de forma separada e em laboratórios diferentes: O ADN das amostras tumorais foi extraído no Laboratório da Direcção de Serviços de Agricultura e Pecuária em Ponta Delgada, com a colaboração da Eng.^a. Aida Medeiros e o ADN das amostras controlo (sem lesões neoplásicas visíveis) foi extraído no Laboratório Regional de Veterinária em Angra do Heroísmo, com a colaboração da Eng.^a. Sandra Benevides.

A técnica de PCR foi otimizada no Laboratório de Virulogia do “*Institute of Comparative Medicine, Division of Pathological Sciences*”, da Universidade de Glasgow, sob a orientação da Prof^a. Saveria Campo e do Dr. George Chambers. Foram utilizadas várias concentrações de reagentes, bem como, diferentes temperaturas e ciclos de hibridização, para obter o melhor produto amplificado. As condições de realização do PCR foram as seguintes: (i) desnaturação inicial do ADN num termociclador (UNO II) durante 5 min a 94°C, desnaturação durante 1 min a 94°C; (ii) anelamento, durante 1 min a 56°C; (iii) extensão, durante 1 min (45 ciclos) e 10 min a 72°C para a extensão final.

Todas as reacções foram preparadas com um controlo positivo de um plasmídeo de BPV-2 usando duas sequências de oligonucleotídeos específicas designadas por *primers*. Um de iniciação: 5'-TTGCTGCAATGCAACTGCTG-3' e um *primer* reverso: 5'-TCATAGGCACTGGCACGTT-3' e um controlo negativo. Estes conjuntos de *primers* amplificam o fragmento 311 pares de bases (pb) da região compreendida entre a porção terminal 3' do gene E5 e a porção terminal 5' do gene L2 para o BPV-2 (Otten et al., 1993). Para avaliação da integridade do ADN todas as amostras foram submetidas a PCR utilizando um *primer* com uma sequência de ADN derivada da actina-1 bovina (Sibbet et al., 2000): 5' ATCCAGGCTGTGCTGTCTCT 3' (nt 178-197) e 5' ATCTCCTGCTCGAAGTCCAA 5' (nt 433-452). Apenas as amostras validadas por este método foram usadas para a detecção da sequência viral dos BPV-2. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose para electroforese.

6.3 Resultados

Os resultados obtidos na amplificação do ADN viral do BPV-2 por PCR em amostras de bexiga de bovino com e sem lesões tumorais apresentam-se na Tabela 6.3. Constatou-se que as sequências de ADN de papilomavírus tipo 2 estão presentes em cerca de 42% do total das amostras analisadas. Tanto as amostras tumorais como as não tumorais apresentaram valores similares de ADN de BPV-2 sem que se tenham registado diferenças significativas entre as duas populações estudadas ($p>0,05$).

Tabela 6.3 Resultados da pesquisa de papilomavírus tipo 1 e tipo 2 em amostras de ADN da bexiga de bovinos com e sem lesões tumorais.

Amostras	Positivas (n) %	Negativas (n) %
• Tumorais (n=200)	(83) 41,5	(117) 58,5%
• Controlos (n=100)	(43) 43	(57) 57
• Total (n=300)	(126) 42	(174) 58

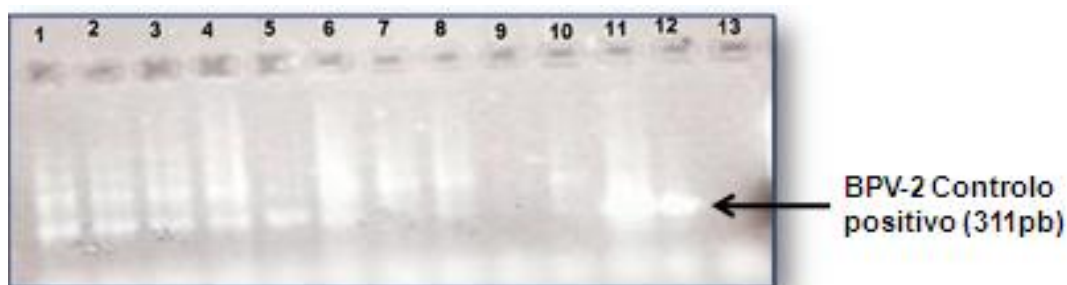


Figura 6.6. Resultados obtidos na electroforese de 11 amostras amplificadas por PCR para detecção de BPV-2. Amostras positivas com bandas de 311 pb: 1, 2, 3 ,4 e 5; Controlo Positivo: 12; Controlo Negativo: 13.



Figura 6.7. Resultados obtidos na electroforese de amostras de ADN da bexiga amplificadas por PCR após a utilização de um *primer* derivado do ADN da actina bovina. Todas as amostras revelam boa integridade do ADN.

6.4 Discussão

Os resultados obtidos indicam que as infecções por BPVs apresentam uma prevalência elevada na população bovina da ISM. Este facto poderá dever-se à elevada densidade populacional bovina numa área geográfica reduzida, facilitando a transmissão e a perpetuação destes vírus. Constatou-se que 42% das amostras estudadas (n=300) revelaram positividade ao BPV dos tipos 1 e 2 e que não existem diferenças significativas entre as populações com e sem Tbx. Nas lesões neoplásicas obtidas de 200 bexigas foi identificado ADN viral em 83 (41,5%); enquanto em 100 amostras controlo (bexigas aparentemente saudáveis), o ADN viral foi detectado em 43 %. Na tabela 6.4 apresentam-se os dados obtidos por outras equipas de investigação no rastreio de BPV 1 e 2 em amostras de bexiga de bovino com e sem lesões tumorais.

A informação obtida sugere que as infecções por BPV serão insuficientes para desencadear o aparecimento de neoplasias da bexiga nos bovinos, sem a intervenção concomitante de outros carcinogénios. O ADN viral presente nas bexigas normais reflecte, provavelmente, a presença de infecções latentes pelo BPV. Realça-se o facto de as infecções por papilomavírus serem, na maioria dos casos,

caracterizadas pelo aparecimento de infecções latentes, sub-clínicas e persistentes, que podem conduzir à formação de tumores benignos (Roperto et al., 2009).

Tabela 6.4. Compilação dos dados obtidos por diferentes equipas de investigação no rastreio de BPV 1 e 2 em amostras de bexiga de bovino com e sem lesões neoplásicas

Grupo de investigadores	Nº de amostras positivas (%)	Técnica utilizada	Observações
• Campo et al., 1992	7/15 (46)	<i>Southern blot</i>	Tbx de ocorrência natural
	9/13 (69)	<i>Southern blot</i>	Tbx induzidos experimentalmente
• Borzacchiello et al., 2003	46/60 (77)	PCR	Tbx de ocorrência natural
	17/34 (50)	PCR	Amostras de bexiga normais (controlos)
• Wosiacki et al., 2005	7/12 58	PCR	Tbx de ocorrência natural
	1/10 10	PCR	Amostras de bexiga normais (controlos)
• Benevides et al., 2006	83/200 (42)	PCR	Tbx de ocorrência natural
	43/100 (43)	PCR	Amostras de bexiga normais (controlos)
• Balcos et al., 2008	13/19 (68)	PCR	Tbx de ocorrência natural
	1/1 (100)	PCR	Amostras de bexiga normais (controlos)
• Resendes et al., 2010	13/46 (28)	PCR	Tbx de ocorrência natural

As toxinas do feto comum, ou outros factores imunodepressores, podem activar estas infecções latentes (Campo et al., 1992; Campo, 1997, 2000). Os vírus e as toxinas do feto comum parecem actuar de forma sinérgica na indução da transformação celular e no bloqueio da actividade do sistema imunitário (Borzacchiello et al., 2003). Outra hipótese a considerar será a possibilidade das amostras de bexigas normais, usadas como controlos, no momento da amostragem, não estarem livres de infecções por BPV, contendo lesões microscópicas de expressão sub-clínica. É também possível que a infecção pelo BPV-2 não seja um pré-requisito para a génese de todas as neoplasias da bexiga.

Vários investigadores analisaram ainda a expressão das oncoproteína E5 e E7 do BPV-2, a actividade da telomerase (Borzacchiello et al., 2003, 2006; Balcos et al., 2008) tendo concluído que apenas as amostras obtidas de tecidos tumorais revelaram positividade nestes testes. Amostras de 42 Tbx colhidas em bovinos provenientes de explorações da ISM revelaram positividade ao ADN do BPV-2 em 28,2% das amostras neoplásicas, bem como expressão da proteína E5 em todas as amostras tumorais (Resendes et al., 2010). Curiosamente, em duas amostras de tecidos não neoplásicos, com diagnóstico de cistite, também revelaram a presença de ADN viral do BPV-2; adicionalmente foi observado que nas amostras cujo urotélio se apresentava normal ou revelava displasia, também foi constatada imunoreacção, de baixa intensidade, com a proteína E5. A marcação para esta proteína foi muito débil nas células endoteliais e nos hemangiomas (Resendes et al., 2010).

Estes resultados sugerem que as oncoproteínas virais podem ter um importante papel na etiopatogenia dos Tbx / HEB dos bovinos.

O estado de latência viral poderá ser activado por acção de carcinogénios químicos e/ou factores imunossupressores presentes no feto comum, os quais fazem despoletar a expressão dos genes virais (Borzacchiello et al., 2003, 2006; Borzacchiello e Roperto, 2008).

A informação obtida no presente trabalho sugere igualmente que os BPV podem estar envolvidos na génese da HEB. Contudo, parecem necessitar da participação de outros factores carcinogénios adicionais para que se verifique conversão maligna das neoplasias, tal como o preconizado por Campo et al., (2000), para os BPV-4 e os carcinomas do tracto digestivo superior.

À semelhança do que foi descrito por zur Hausen (2009) para o carcinoma cervical humano: "...embora mais de 95% das biópsias revelem a presença de genomas de HPV de elevada malignidade, este número não significa ou implica necessariamente que todos estes tumores sejam provocados por infecções por HPV.", pode dizer-se o mesmo para os Tbx dos bovinos.

7. Prevenção da Hematúria Enzoótica Bovina

7.1. Introdução

Tendo em conta os resultados obtidos nos capítulos 2 e 3 – “Estudo epidemiológico” e “Hematologia e observações clínicas”, respectivamente, foram implementadas medidas de controlo e/ou erradicação do *Pteridium aquilinum* nas pastagens micaelenses e foram sensibilizados os bovinicultores para a adopção de melhorias no manejo alimentar dos bovinos das faixas etárias mais jovens. Estas medidas preventivas visaram a diminuição da exposição dos animais às toxinas do feto comum e consequentemente a prevenção do aparecimento de HEB e casos de IAF nas explorações.

As medidas de controlo e erradicação do feto comum nas pastagens devem ter em consideração algumas características biológicas desta planta. Em termos morfológicos, o feto comum é composto por uma parte aérea e outra subterrânea, (Thomson, 1990) designadas por fronde e rizoma, respectivamente (Fig. 7.1).

Estima-se que por cada fronde existam pelo menos 5 m de rizoma, que forma uma rede subterrânea extensa e complexa. Cada hectare de terra infestada pelo feto pode conter mais de 200 toneladas de rizomas, com milhares de rebentos dormentes por metro quadrado (Robinson, 2006).

A expansão da planta na pastagem faz-se predominantemente pelo crescimento e ramificação dos rebentos terminais do rizoma (Page, 1986). Estes, quando em crescimento activo, são as únicas porções sensíveis à acção dos herbicidas sistémicos recomendados no combate a esta infestante.

A eficácia máxima da aplicação do herbicida obtem-se quando há maior número de frondes maduras, com os pares de pinas completamente desenroladas, verdes escuras e duras ao toque, como acontece nos meses de Julho a Outubro. Durante este período, a planta sintetiza reservas nutritivas nas frondes que são transportadas para o rizoma e aqui armazenadas. Os herbicidas sistémicos utilizados no seu combate têm absorção foliar, são transferidos para o rizoma e têm como alvo as células em crescimento dos rebentos terminais activos do rizoma (Fig. 7.1).

O controlo e erradicação do feto das pastagens é mais fácil e eficiente por via química utilizando herbicidas sistémicos, como o Asulam, comercializado com o nome de Asulox® e o glifosato, que se apresenta no mercado com vários nomes comerciais. O

Asulam é o herbicida mais selectivo existente no mercado para o feto comum; este quando é aplicado nas concentrações recomendadas pelo fabricante, não danifica as plantas forrageiras, nem as plantas das sebes divisórias das pastagens, como as hortênsias, canas, buxos e outras, que fazem parte da paisagem açoriana. Os herbicidas que contêm glifosato como princípio activo, são igualmente efectivos no combate ao feto comum. Contudo, danificam as plantas forrageiras e aquelas existentes nas sebes divisórias das pastagens.

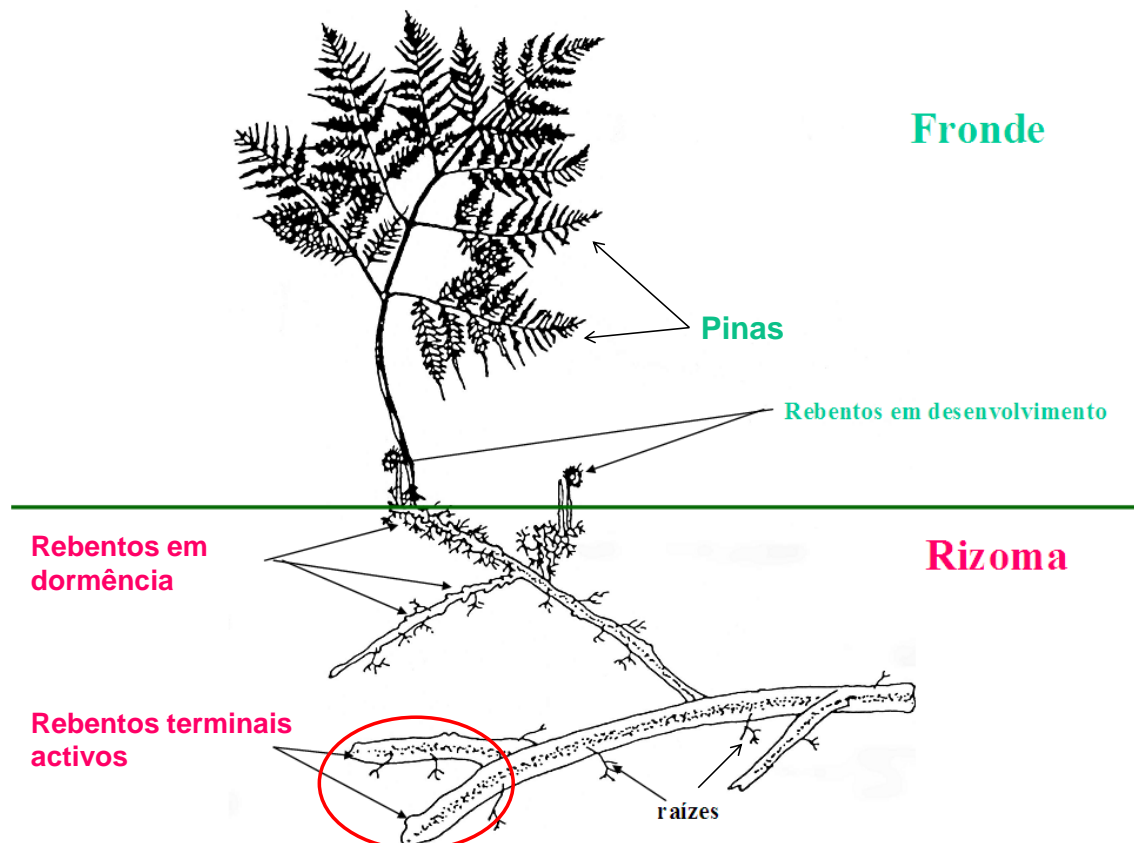


Figura 7.1. Principais aspectos morfológicos do *Pteridium* spp. A linha horizontal indica a separação da componente aérea (fronde) da subterrânea (rizoma); os rebentos terminais activos do rizoma, circundada pela oval a vermelho, representam os tecidos-alvo para o herbicida sistémico. Adaptado de Thomson, 1990 e Robinson, 1999.

A melhoria do manejo alimentar faz parte do programa de prevenção da HEB. É sabido que os bovinos, sobretudo nos períodos de maior escassez forrageira, revelam maior apetência para as partes mais tenras (rebentos e frondes) do feto comum. São, assim, preconizadas algumas medidas que visam limitar ou impedir a exposição dos bovinos às toxinas desta planta, como por exemplo: a) evitar que os animais sejam amarrados à estaca em pastagens infestadas pelo feto; b) colocar as cercas eléctricas afastadas das sebes e paredes divisórias infestadas; c) afastar as unidades móveis de

ordenha de áreas infestadas; d) evitar adubações repetidas à base de nitratos que levam a um crescimento mais rápido da erva, uma vez que esta apresenta um valor nutritivo inferior, aumenta a apetência dos bovinos para o consumo de infestantes; e) evitar o pastoreio em áreas onde foram realizados recentemente cortes para silagem, visto que a erva remanescente após o corte, junto às paredes e sebes divisórias das pastagens, pode conter infestantes prejudiciais aos bovinos, entre as quais o feto comum; f) suplementar os bovinos com minerais para minimizar a ocorrência de carências, consequente perversão do apetite e maior predisposição para a ingestão de plantas tóxicas; h) remover os fetos que foram cortados da pastagem para evitar a sua ingestão no pastoreio seguinte; i) promover o desenvolvimento retículo-ruminal dos vitelos até ao desmame e durante os primeiros seis meses de vida, através do fornecimento de dietas ricas em amido. Estas promovem a formação de ácidos gordos voláteis que são o principal estímulo ao desenvolvimento das papilas ruminais, com consequente aumento da funcionalidade dos reservatórios gástricos.

7.2. Material e métodos

O programa de prevenção da HEB por controlo do feto comum nas pastagens micaelenses foi iniciado no Verão de 2001 e continuado até ao presente. Realizaram-se cerca de 30 sessões de formação profissional para bovinicultores nas freguesias da ISM mais afectadas pela HEB, desde Julho de 2002 até Julho de 2006. As acções desenvolvidas visaram sensibilizar os produtores para os efeitos nocivos na saúde bovina da ingestão do feto comum e para a necessidade de correcção de determinadas práticas de manejo consideradas de risco para a HEB. Explicaram-se os diferentes métodos de controlo do *P. aquilinum* nas pastagens, bem como as épocas do ano mais favoráveis ao tratamento com herbicida.

Foi elaborado e distribuído aos produtores interessados um folheto explicativo sobre a HEB, intitulado “*Vacas que urinam com sangue (hematúria enzoótica): Como prevenir e controlar a doença?*” (ver anexo 4).

Foram treinados e preparados cerca de 15 elementos do Curso Técnico de Gestão Pecuária Nível III (CTGP III) do Serviço de Desenvolvimento Agrário (Fig. 7.2-A) de São Miguel, para a aplicação de herbicida selectivo contra o feto das pastagens. Estas acções de formação tiveram a supervisão do Dr. Roderick Robinson, reputado especialista em controlo do feto comum, foram abertas aos técnicos das duas Associações Agrícolas de São Miguel e aos produtores em geral.



Figura 7.2. Tecnologias de controlo e erradicação do feto comum com aplicação de herbicidas nas condições de relevo e tipo de infestação pelo *P. aquilinum* existente nas pastagens micaelenses.; (A) utilização de “spot-gun”, que consiste na aplicação manual de pulverizações dirigidas a cada fronde (um borrifo de 0,5ml/fronde), este método é recomendável para áreas pouco infestadas e/ou inacessíveis a outros meios mecânicos, como a (B) moto-4, que é o método mais efectivo, de fácil utilização e de maior rapidez nas infestações do tipo linear em que o feto comum se encontra distribuído predominantemente junto às barreiras e sebes divisórias das pastagens; (C) sistema Ulva[®], Micron, ou “helicóptero de mão”, apropriado para terrenos muito íngremes, inacessíveis à moto-4 e densamente infestados; funciona com baterias recarregáveis.

A partir de 2004, foi constituída uma brigada especializada (Fig. 7.2 B) na aplicação de herbicidas apropriados ao combate do feto comum nas pastagens. Esta brigada interveio nas pastagens de cerca de 150 bovinicultores micaelenses, durante os meses de Julho a Novembro dos últimos seis anos, tendo sido tratados cerca de 1 770 Hectares de pastagem.

Foi ainda preparado um “spot-televisivo”, para o programa de divulgação agrária da RTP-Açores, intitulado: “*Controlo do feto comum nas pastagens dos Açores*”.

O tema da toxicidade pelo feto comum nos bovinos e a sua prevenção faz parte do programa do curso de formação profissional para empresários agrícolas que pretendam obter apoios comunitários para a primeira instalação pecuária. Estes cursos são promovidos pela Secretaria Regional de Agricultura e Florestas dos Açores, têm normalmente 12 a 15 participantes por curso. São realizados, em média, 2 a 3 cursos por ano, com duração de cerca de 200 horas distribuídas por vários módulos.

7.3. Resultados

Desde o início da implementação do programa de prevenção da HEB, tem-se notado um interesse crescente por parte dos bovinicultores micaelenses na eliminação do feto comum das pastagens e uma maior sensibilização para as suas implicações na saúde dos bovinos da ingestão desta planta.

Os resultados obtidos no programa de epidemiovigilância dos Tbx no MISM apontam para uma redução no número total de rejeições de carcaças de bovino a partir de 2003 (Tab. 2.6 – Cap. 2). Este decréscimo foi mais acentuado nos três últimos anos, em que se verificou uma queda notória na taxa percentual de reprovações de bovinos por Tbx, (Gráfico 2.4 – Cap. 2), passando de 18,1% em 2006 para 8,8% em 2009. Em conformidade com estes resultados, registou-se uma redução de 45% no número de explorações atingidas por Tbx (Gráfico 2.5 – Cap. 2) desde 2004 até 2009, passando de cerca de 60% para 33% de explorações afectadas neste período.

Os produtores que aderiram mais cedo ao programa de prevenção da HEB revelaram que houve diminuição significativa dos casos de “*vacas urinando com sangue*”, tendo mesmo desaparecido os casos clínicos (vacas com hematúria) na exploração.

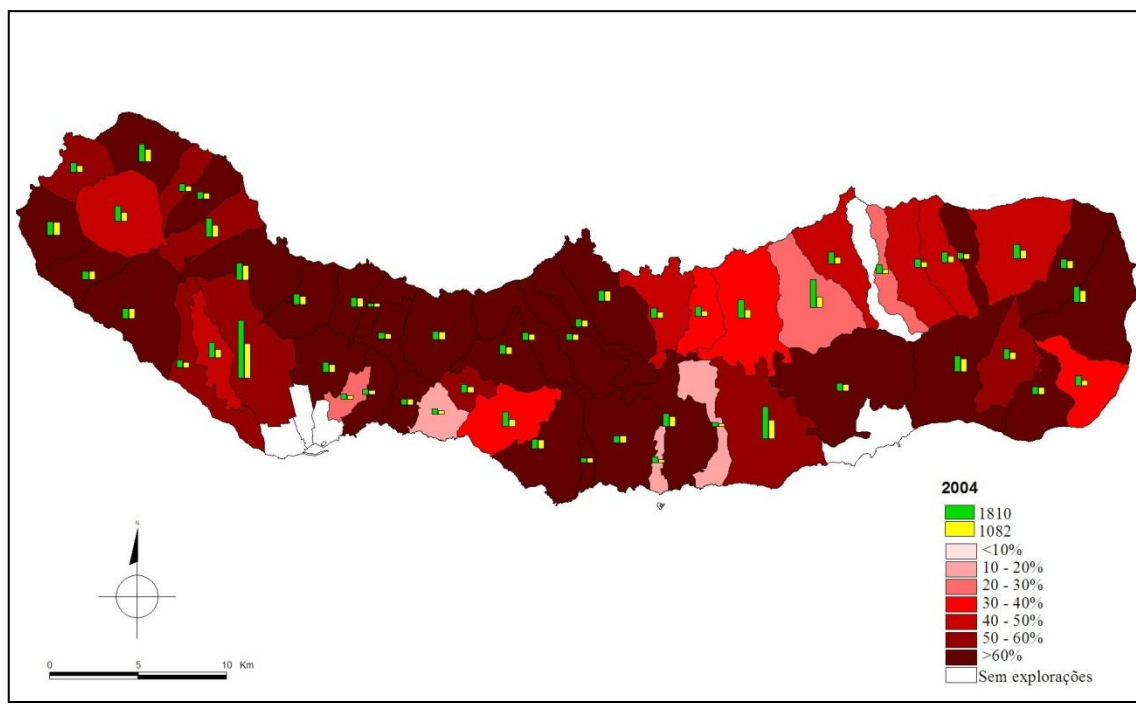


Figura 7.3. – Distribuição geográfica por freguesia de 2101 tumores de bexiga diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel no ano de 2004

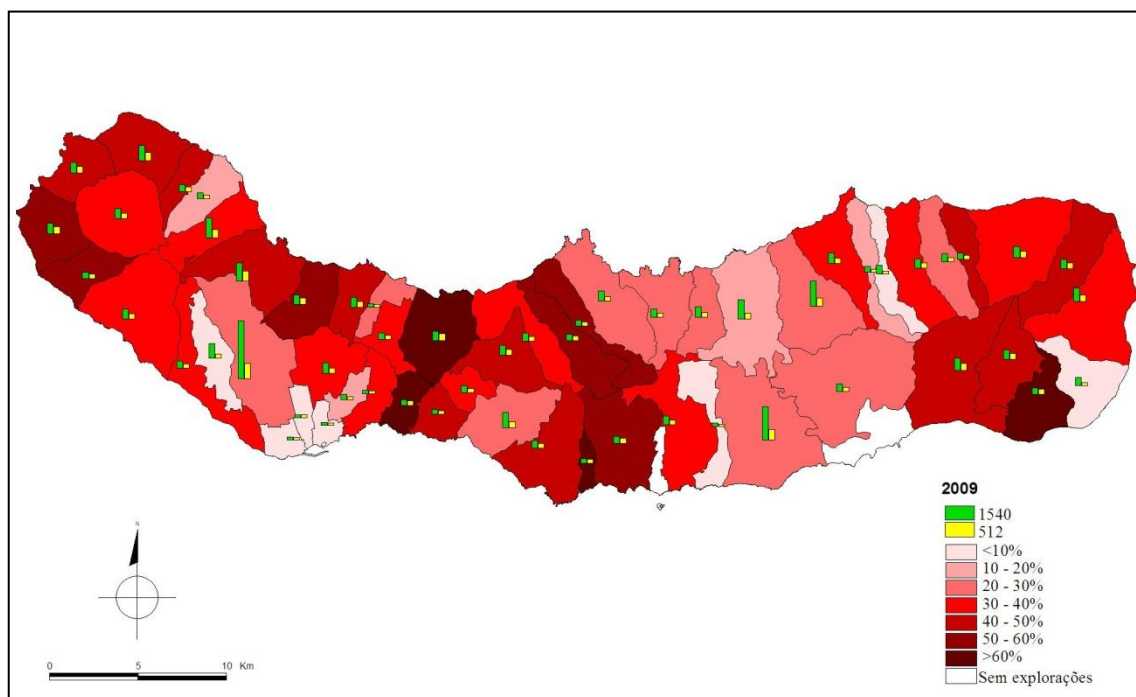


Figura 7.4. – Distribuição geográfica por freguesia de 849 tumores de bexiga diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel no ano de 2009

No Gráfico 7.1 apresentam-se os dados relativos à evolução ocorrida no número de Tbx diagnosticados no MISM em bovinos provenientes de uma exploração micaelense, com cerca de 230 vacas leiteiras, onde foram identificados graves problemas de HEB e surtos de IAF em novilhas. Os problemas, nesta exploração, agravaram-se no final da década de 90, coincidindo com o início da utilização de pastagens muito infestadas pelo *P. aquilinum* para pastoreio das novilhas de substituição. Estas pastagens localizam-se no Pico de Salomão, a cerca de 150 m de altitude e apresentam uma orografia muito irregular (Fig. 7.5).

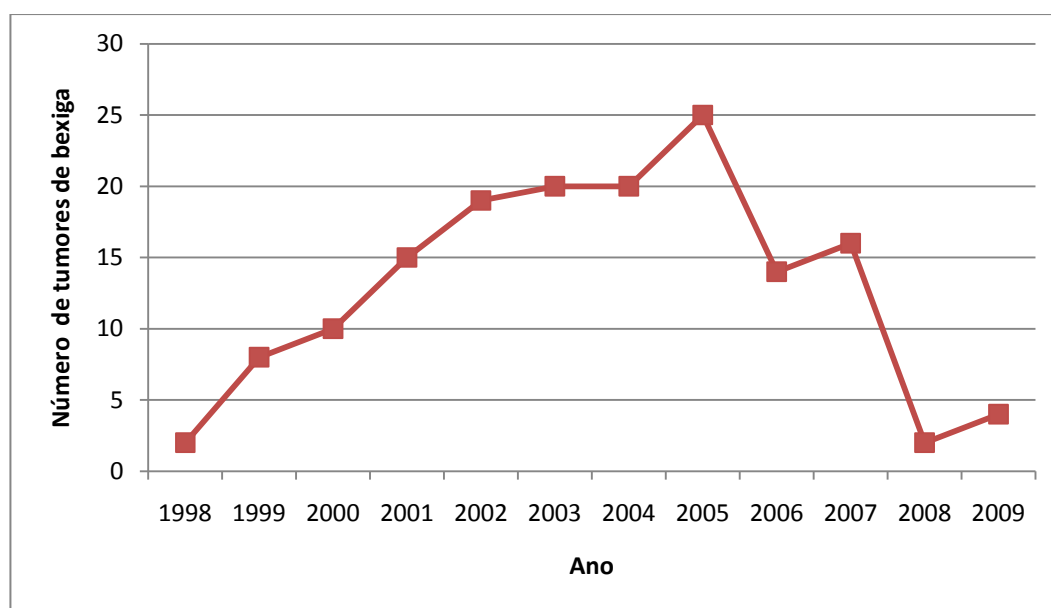


Gráfico 7.1. Evolução do número de tumores de bexiga diagnosticados no Matadouro Industrial de São Miguel, no período compreendido entre 1998 a 2009, numa exploração com cerca de 230 vacas leiteiras onde se registaram graves problemas de hematúria enzoótica e de intoxicação aguda pelo feto comum. Foram implementadas medidas de controlo do feto comum a partir de 2002 e registaram-se grandes alterações no maneio alimentar das novilhas a partir de 2005.

Foi-nos relatado pelo produtor que desde que iniciou o pastoreio nos terrenos localizados no Pico de Salomão, todos os anos havia registos de casos de “carbúnculo” que levavam à morte de algumas novilhas. Em Agosto de 2002, tivemos oportunidade de verificar que os casos diagnosticados como carbúnculo hemático seriam casos de IAF, visto que alguns dos sintomas apresentados são similares nestas duas doenças. O surto de IAF foi comprovado por exame clínico, exames hematológicos e necrópsia realizada a uma das novilhas (Pinto et al., 2007). Os teores de ptaquilósido doseados em amostras de feto comum colhidas destas pastagem foram muito elevados $8\,444\,\mu\text{g/g}^{-1}$.

A partir do ano de 2005, este produtor deixou de explorar as pastagens localizadas no Pico de Salomão (Fig. 7.5.), na sequência do que se registaram grandes alterações no manejo alimentar das novilhas, com estabulação até cerca do ano de idade, ausência de exposição às toxinas do feto comum e suplementação mineral adequada de todos os grupos etários de bovinos. Os problemas derivados da toxicidade provocada pelo feto comum diminuíram significativamente, nos últimos 4 anos, tendo desaparecido os surtos de IAF, os casos clínicos de HEB e o nº de casos diagnosticados de Tbx no MISM caiu abruptamente (Gráfico 7.1.).



Figura 7.5.. Novilhas em pastoreio no Pico de Salomão no Verão (Jul/04). As plantas forrageiras são escassas, secas e com pouco valor nutritivo. As manchas verdes correspondem a áreas infestadas pelo feto comum.

7.4. Discussão

A abordagem tradicional ao controlo do feto das pastagens, por parte dos produtores micaelenses, tem sido o corte do feto, realizado na maioria dos casos uma ou duas vezes por ano, normalmente no final do Verão e após o pastoreio; esta prática estimula o aparecimento de rebentos novos, tenros, mais palatáveis e mais tóxicos para os bovinos, podendo agravar, desta forma, a toxicidade provocada pela ingestão da planta.

Segundo McKenzie (1978), tanto o corte como a queima dos fetos são medidas ineficazes no controlo da infestação. Estas práticas de manejo da pastagem estimulam o rápido desabrochar de novos rebentos a partir do rizoma e reduzem a competição de outras plantas para a exposição solar, aumentando a capacidade de crescimento e dispersão do feto comum na pastagem.

A renovação das pastagens, com lavradio e sementeira de outras culturas nos terrenos aráveis e onde esta intervenção é possível, constituem também uma prática recomendável para o controlo do feto comum nas condições de produção açorianas. O feto comum encontra-se disseminado pelas pastagens da ISM, sobretudo junto às sebes e paredes divisórias e nos terrenos mais íngremes e difíceis de cultivar, por esta razão não é possível, ou recomendável por razões económicas e/ou erosão dos solos a renovação das pastagens com sementeira de outras culturas, sendo mais útil, nesta circunstâncias, o combate desta infestante por via química, com recurso a herbicidas apropriados.

Tem-se assistido a uma redução progressiva e consistente do nº de Tbx diagnosticados no MISM, bem como, uma diminuição da percentagem de explorações atingidas pela HEB / Tbx desde 2004 (Tab. 2.6, Fig. 7.3 e 7.4).

Nas explorações com problemas de HEB onde se implementaram há mais tempo medidas de controlo do feto das pastagens, constata-se actualmente uma diminuição acentuada do número de animais com sinais clínicos da doença, bem como diminuição do número de casos de Tbx nos bovinos abatidos (Gráfico 7.2). No matadouro como são abertas de forma sistemática as bexigas de todos os bovinos abatidos, ainda vão aparecendo alguns casos de Tbx nos bovinos provenientes das explorações que aderiram ao programa de prevenção da HEB acima mencionado. Será de esperar, no futuro, a manutenção de um número residual de casos de HEB / Tbx, uma vez que a eliminação total do feto é praticamente impossível. Estes tumores detectados no exame *post-mortem*, sem qualquer manifestação clínica de hematúria enzoótica, podem considerar-se manifestações sub-clínicas da doença.

Os resultados obtidos sugerem que as acções desenvolvidas no âmbito do programa de prevenção da HEB implementado na ISM estão a surtir efeito positivo, devendo, por isso, ter continuidade nos próximos anos.

Segundo Robinson, 2000a, 2000b e 2006, o sucesso da erradicação do feto das pastagens implica ainda ter em consideração os aspectos seguintes: i) é um processo

demorado, pois pode levar mais de 5 anos; ii) os tratamentos deverão ser repetidos anualmente até que novas frondes ou rebentos desapareçam na totalidade; iii) nenhum tratamento único consegue eliminar completamente a infestante; ii) o tratamento não deve ser interrompido, pois o feto começa a desabrochar a partir dos rebentos dormentes e a invadir de novo a pastagem.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A caracterização epidemiológica e clínica dos casos observados de HEB e dos surtos de IAF nas explorações micalenses confirmou a toxicidade do feto comum, *Pteridium aquilinum*, nos bovinos em pastoreio. Provou-se haver associação, estatisticamente significativa, entre a ingestão voluntária e continuada desta infestante das pastagens e o aparecimento de HEB/Tbx nos bovinos. As amostras de feto comum colhidas em explorações com graves problemas de HEB e IAF revelaram níveis elevados de Pta, considerado a principal toxina desta planta.

A população de vacas leiteiras (fêmeas paridas com mais de 2 anos de idade) foi a que revelou maior prevalência de HEB e de Tbx no MISM. Neste grupo de bovinos a taxa de reprovação de carcaças por Tbx atingiu valores de 17 a 18% no período compreendido entre 2002 a 2006. Actualmente, esta taxa apresenta tendência decrescente, tendo sido de 8,8% em 2009. Os bovinos machos revelaram taxas de reprovação por Tbx inferiores a 1%, sendo apenas de 0,22% nos novilhos até aos dois anos de idade. Justifica-se esta baixa incidência pelo facto destes bovinos serem criados em regime de estabulação, em unidades intensivas, sem acesso ao pastoreio e, conseqüentemente, sem exposição às toxinas do feto comum; adicionalmente estes animais não vivem o tempo suficiente para desenvolverem lesões neoplásicas vesicais.

As freguesias e as explorações pecuárias da ISM que revelaram maior número de casos de HEB/Tbx são aquelas cujas pastagens se localizam a baixa altitude (<200 m), em áreas de orografia mais irregular, na proximidade de ribeiras e linhas de água e com solos pobres em termos de produção forrageira. Nestas pastagens, o feto comum está presente ao longo de todo o ano, devido às temperaturas do ar mais elevadas e à menor humidade do solo. Estas condições, associadas à elevada carga animal, favorecem a ocorrência de casos de IAF e HEB. São exemplos de áreas consistentemente mais afectadas por estas doenças, as freguesias localizadas nas encostas Norte e Sul do maciço vulcânico da Lagoa do Fogo e nos extremos oriental (Faial da Terra) e ocidental (Ginetes) da ISM.

As condições edafo-climáticas existentes nos Açores favorecem fortemente a presença e a persistência do feto comum. Adicionalmente, foram identificadas práticas de manejo e de gestão das pastagens que promovem e/ou favorecem a ingestão desta infestante pelos bovinos: a) constatou-se que a maioria dos bovinicultores da

ISM roçavam o *P. aquilinum*, após o pastoreio, possibilitando deste modo o aparecimento de rebentos novos e tenros da planta, que são as partes que apresentam maiores níveis de Pta, sendo mais facilmente consumidas pelos bovinos devido à sua maior palatabilidade. Esta prática de manejo promove o consumo da planta pelos bovinos e exacerba a sua toxicidade; b) ausência de remoção da massa vegetal produzida após o corte das plantas, permitindo-se que os bovinos comam os resíduos secos, que veiculam ainda os compostos tóxicos do feto comum; c) existência de períodos de escassez forrageira e situações de fome nas explorações de bovinos mais atingidas pela HEB, devidas a condições climáticas adversas e/ou provocadas por encabeçamentos excessivos; d) constituição de grupos heterogêneos de bovinos que pastoreiam em simultâneo na mesma pastagem, dando lugar a disputa pelo alimento, com favorecimento dos animais dominantes; e) deficiente manejo alimentar dos bovinos das faixas etárias mais jovens com ausência de qualquer suplementação mineral e/ou alimento concentrado nos bovinos em pastoreio permanente; f) carências em fósforo e em cobalto nos solos e plantas forrageiras, as quais são causa de apetite desviante nos bovinos, podendo levar à ingestão do feto comum; f) carência em fibra estruturada, necessária à ruminação, nos pastos novos e suculentos; g) pastoreio das novilhas em pastagens onde foram realizados cortes para produção de silagem de erva. Nestas condições, os animais são obrigados a consumir os restos de erva e infestantes que permanecem nas parcelas de pastagem junto às barreiras, sebes divisórias e áreas inacessíveis à ensiladora; h) ausência de água à disposição dos bovinos das faixas etárias mais jovens, em muitas explorações.

Registaram-se diferenças significativas nos parâmetros hematológicos estudados entre novilhas oriundas de explorações com e sem registo de casos de HEB/Tbx. As diferenças observadas podem dever-se a diferenças no manejo alimentar e a maior exposição às toxinas do feto comum nas explorações com casos de HEB e IAF. Constatou-se haver hipocromasia e microcitose em ambas as populações de novilhas, com e sem problemas de HEB, o que é sugestivo de subnutrição e carência em ferro, cobre e cobalto.

Os resultados obtidos no estudo hematológico nas diferentes situações clínicas ou sub-clínicas sugerem o envolvimento de carências minerais na génese dos processos de intoxicação aguda ou crónica pelo *P. aquilinum* nos bovinos dos Açores. O estudo aprofundado das carências em OE permitiu concluir que os bovinos desta Região são naturalmente carenciados em zinco, cobre, selénio, iodo e cobalto. Deve-se este facto

ao pastoreio permanente em solos de origem vulcânica. São particularmente deficitários os bovinos em pastoreio das faixas etárias mais jovens, devido à ausência de suplementação com alimentos concentrados e/ou minerais em grande número de explorações.

Constatou-se déficit generalizado de iodo plasmático nos bovinos da quase totalidade das 70 explorações rastreadas, algumas das quais com valores críticos de iodo $<15 \mu\text{g L}^{-1}$, compatíveis com hipotireoidismo. Os baixos valores de T_4 doseados nas vacas leiteiras corroboram esta possibilidade. Este facto pode justificar o aparecimento nas manadas de problemas de infertilidade, baixas de produtividade, elevada mortalidade peri-natal e fraco crescimento das novilhas de reposição. O excesso de nitratos nas pastagens e de alguns minerais nos solos como o cálcio, o potássio, o flúor e o arsénio, associados a déficit em selénio, justificam a deficiente absorção de iodo no tubo digestivo, bem como a menor captação deste elemento pela tiróide. O recurso generalizado por parte dos produtores à utilização de adubos à base de azoto, potássio e fósforo, desprovidos de qualquer oligoelemento (OE), leva à exaustão dos solos nestes nutrientes, com consequências muito negativas na produção bovina e mesmo na cadeia alimentar.

Foram identificadas diferenças significativas nos valores de GPx entre novilhas provenientes de explorações com e sem problemas de HEB/Tbx. Esta informação aponta para que o selénio possa desempenhar um importante papel na génese desta patologia. Mais de 80% das explorações rastreadas apresentavam valores deficitários de GPx nos bovinos. As carências em selénio foram mais acentuadas na população de bovinos jovens criados em pastoreio que nas vacas leiteiras. As diferenças observadas no manejo alimentar entre os vários grupos de bovinos justificam as diferenças observadas nos níveis de GPx. Os solos ácidos e com pouco arejamento, possibilitam a formação de compostos insolúveis de selénio com o hidróxido de ferro, tornando este OE indisponível para absorção pelas plantas; adicionalmente, solos ricos em sulfato impedem a captação de selénio pelas plantas. O selénio é normalmente lixiviado das camadas superiores do solo nas áreas de elevada pluviosidade e, consequentemente, as forragens aí produzidas apresentam baixos teores deste OE.

O déficit em cobre e zinco contribui para a diminuição das defesas antioxidantes por prejudicar o funcionamento da Cu-Zn SOD, tornando o organismo mais vulnerável ao stresse oxidativo.

A informação obtida no rastreio de OE na população bovina em geral, indica que as novilhas HF são um grupo particularmente deficitário em OE e por conseguinte mais vulnerável ao efeito dos xenobióticos, tais como as toxinas do feto comum.

Os quadrantes inferiores e as áreas envolventes do trígono vesical da superfície interna da bexiga foram as que apresentaram maior número de lesões neoplásicas e inflamatórias. Esta informação reforça o provável envolvimento do Pta e de outras toxinas do feto comum na etiopatogenia da HEB.

No rastreio de ADN viral de BPV-2 realizado em 300 amostras de bexigas de bovino constatou-se uma elevada prevalência de infecções por PVs na população bovina da ISM. Nas lesões neoplásicas obtidas de 200 bexigas foi identificado ADN viral em 83 (41,5%); enquanto em 100 amostras controlo (bexigas aparentemente saudáveis), o ADN viral foi detectado em 43 %. A informação obtida sugere que as infecções por BPV serão insuficientes para desencadear o aparecimento de neoplasias da bexiga nos bovinos, sem a intervenção concomitante de outros carcinogénios. O ADN viral presente nas bexigas normais reflecte, provavelmente, a presença de infecções latentes pelo BPV. As toxinas do feto comum e/ou outros factores imunodepressores, podem activar estas infecções latentes. Os vírus e as toxinas do feto comum parecem actuar de forma sinérgica na indução da transformação celular e no bloqueio da actividade do sistema imunitário. Os resultados obtidos por outros investigadores na pesquisa de oncoproteínas virais, designadamente E5 e E7, sugerem que os BPVs podem ter um importante papel na etiopatogenia dos HEB/Tbx. A informação obtida no presente trabalho sugere igualmente que os BPV podem estar envolvidos na génese da HEB. Contudo, parece necessitar da participação de outros factores carcinogénios adicionais para que se verifique transformação neoplásica.

Como consequência das medidas profilácticas implementadas para a HEB na ISM, tem-se assistido a uma redução progressiva e consistente do número de Tbx diagnosticados no MISM, bem como diminuição da percentagem de explorações atingidas pela HEB/Tbx, desde 2004. Nesse ano, cerca de 60% (1082/1810) apresentaram para abate pelo menos uma vaca com Tbx; em 2009, o número de explorações afectadas diminuiu para 33% (512/1540). Este facto sugere que as acções de vulgarização e formação profissional para sensibilização dos produtores para este problema, realizadas em cerca de 50% das freguesias da ISM, bem como as medidas de controlo e erradicação do feto comum em implementação no terreno pelos

produtores e entidades oficiais, estão a surtir efeito positivo, devendo, por esta razão, ter continuidade nos próximos anos.

A interacção entre as toxinas do feto comum, o stresse oxidativo, facilitado pelas carências em OE identificadas na população bovina, e o papel dos BPVs carece de estudos mais aprofundados, tendo em vista a clarificação dos complexos mecanismos envolvidos na carcinogénese em geral e na etiopatogenia da HEB em particular.

Referências bibliográficas

- Agnew M. P. e Lauren D. R. (1991). Determination of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium esculentum*). *Journal of Chromatography*. **538**, 462-468.
- Alonso-Amelot M. E. e Avendano M. (2001). Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiological study. *International Journal of Cancer*, **91**: 252-259.
- Alonso-Amelot M. E. e Avendano M. (2002). Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Current Medical Chemistry* **9**: 675-687.
- Alonso-Amelot, M. E., Castillo, U., Smith, B. L. & Lauren, D. R. (1996). Bracken ptaquiloside in milk. *Nature*, 382, 587.
- Alonso-Amelot, M. E., Castillo, U., Smith, B. L. & Lauren, D. R. (1998). Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait*, **78**, 413-423.
- Alonso-Amelot, M.E., Castillo, U.F., Avendaño, M., Smith, B. L. and Lauren, D.R. (2000). Milk as a vehicle for the transfer of ptaquiloside: a bracken carcinogen. In: Taylor, J.A. and Smith, R.T., (Eds.) Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control. *Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999*, pp. 86-90. Aberystwyth: International Bracken Group. United Kingdom.
- Amaral A. F. S., Cantor K. P., Silverman D. T., Malats N. (2009). Selenium and risk of bladder cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. *Abstracts / Toxicology Letters*, 189S S57–S273
- Anjos B. L., Irigoyen L. F, Figuera R. L. A., Gomes A. D., Kommers G. D. e Barros C. S. L. (2008). Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):501-507
- Anjos B. L., Irigoyen L. F., Piazer, J. V. M, Brum J. S., Figuera R. L. A. e Barros C. S. L. (2009). Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 29(9):753-766
- Ashrafi G.H., Tsimonaki E., Marchetti B., O'Brien P.M., Sibbet G.J., Andrew L. E Campo M.S. (2002) Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* 21:248–259.
- Azizi F. (2009). Iodine deficiency disorders: Silent pandemic. In *Thyroid International*, nº 4. Ed. Peter PA Smith. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, pp, 1-11.
- Baan R., Grosse Y., Straif K., Beatrice S., Fatiha G., Veronique B., Lamia B., Neela G., Crystal F., Laurent G., Vincent C. (2009) A review of human carcinogens – Part F: Chemical agents and related occupation. *Lancet Oncol.* **10** (12): 1143–4.
- Bach K. G., Slagsvold T., Stenmark H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *The EMBO Journal* (23), 2707-2712.
- Baker D. S., Ahola J. K., Burns P. D., Engle T. E. (2003). Trace mineral metabolism in

- ruminants: impact on production, reproduction and environment Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries – *Proceedings of Alltech's Nineteenth Annual Symposium*, 275–287.
- Bakker, H. J, Dickson, J., Steele, P., Nottle, M. C. (1980). Experimental induction of ovine poliiencephalomalacia. *Vet. Record*, 107(20):464-466.
- Balcos L.G., Borzacchiello G., Russo V., Popescu, O., Roperto S., Roperto F. (2008), Association of Bovine papillomavirus type-2 and urinary bladder tumours in cattle from Romania. *Res. Vet. Sci.*
- Barbosa V. F. M. (1949). Será o Tomadiço uma Doença de Carência? *Boletim da Comissão Reguladora dos Cereais do Arquipélago dos Açores*. Separata nº 9. São Miguel, Açores.
- Barros C. S. L., Graça D. L. e Barros S. S. (1987). Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos do Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinária*, 7(37):33-39.
- Beauchemin K. A. (1991). Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. *Vet. Clinics, Food Animal*, 7 (2):439-463.
- Beck M. A., Levander O. A. e Handy J. (2003). Selenium deficiency and viral infection. *Journal of Nutrition*, 133:1463S-1467S.
- Benevides S., Medeiros A., Garrett F., Bernardo S., Pinto C. (2006). Preliminary studies on the etiological role of bovine papillomavirus on chronic enzootic haematuria. *Proceedings of the International Symposium Intractable Weeds and Plant Invaders*, Ponta Delgada, Azores: 38.
- Benjamin T. e Vogt P. K. (1991). Cell transformation by viruses. In: B.N. Fields and D.M. Knipe, (Chief Eds.), *Fundamental Virology*, Raven Press, New York, pp. 291.
- Bianco A. C. e Kim B. W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116: 2571-2579.
- Black D. H e Frenc N. P. (2004). Effects of three types of trace element supplementation on the fertility of three commercial dairy herds. *Veterinary Record* 154:652-658.
- Borrego S. B. (2006). Estudo Epidemiológico da Leptospirose Canina na Ilha de São Miguel (Açores). Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, 190 pp.
- Borzacchiello G. e Roperto F. (2008) *Bovine papillomavirus*, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39, 45: 1-19.
- Borzacchiello G., Iovane G., Marcante M.L., Poggiali F., Roperto F., Roperto S., Venuti A. (2003). Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J. Gen. Virol.* 84:2921–2926
- Borzacchiello G., Russo V., Gentile F., Roperto F., Venuti A., Nitsch L., Campo, M. S., Roperto S. (2006) Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form

- of the platelet-derived growth factor β receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene* 25, 1251-1260.
- Bringuier P. P e Jean-Blain C. (1987). Hématurie Chronique des Bovins: Étiologie et Épidémiologie. *Le Point Veterinaire*, 19 (107): 393-403.
- Bringuier P. P., Piaton E., Berger N., Dubruyne F., Perrin P., Schalken J. e Devonec M. (1995). Bracken fern-induced bladder tumors in guinea pigs. A model for human neoplasia. *American Journal of Pathology* 147, 858.
- Brinkman M., Buntinx F., Muls E., Zeegers M. P. (2006). Use of selenium in chemoprevention of bladder cancer. *Lancet Oncol.* 7: 766–74.
- Brito R. S (2004). São Miguel a Ilha Verde, Estudo Geográfico (1950-2000). Ed. Fábrica de Tabaco Micaelense, SA; COINGRA, Companhia Gráfica dos Açores; EDA, Empresa de Electricidade dos Açores; Universidade dos Açores: 381 pp.
- Brun R., Urraro C., Medaglia C., Russo V., Borzacchiello G., Roperto F. e Roperto S. (2008). Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder in a cow associated with bovine papillomavirus type-2. *Journal of Comparative Pathology*, 139, 121-125.
- Brun-Hansen H. C., Kampen A. H., Lund A. (2006). Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Vet. Clin. Pathol.*, 35(2):182-187.
- Campo M. S. (1997). Bovine papillomavirus and cancer. *The Veterinary Journal.* 154, 175-188.
- Campo M. S., Beniston R. G., Connolly J. A., e Grindlay, G. J. (1999). Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In Taylor, J. A. and Smith R. T., (Eds.) *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control. Proceedings of the International Bracken Group 4th International Bracken Conference*, University of Manchester pp 116-122.
- Campo M. S., Jarrett W. F. H, Barron R., O’Neil B. W. e Smith K. T. (1992). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research*, 52, 6898- 6904.
- Campo M. S., McCaffery R. E., Doherty I., Kennedy I. M. e Jarrett W. F. H. (1990). The Harvey *ras* 1 gene is activated in papilloma-associated carcinomas of the alimentary tract in cattle. *Oncogene* 5: 303-308.
- Carvalho T., Naydan D., Nunes T., Pinto C. e Peleteiro M. C. (2009). Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic haematuria. *Vet. Pathol.* 46:211–221.
- Carvalho T., Pinto C. e Peleteiro M. C. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic hematuria. *J. Comp. Pathol.*, 134: 336-346.
- Castillo U. F., Wilkins A. L., Lauren D. R., Smith B. L., Towers N. R., Alonso-Amelot M. E. e Jaimes-Espinoza R., (1997). Isoptaquiloside and caudatoside, illudane-type

- sesquiterpene glucosides from *Pteridium aquilinum* var, *caudatum*. *Phytochemistry* 44(5), 901-906.
- Chatuverdi V, Hodges S, Johnston D, Ro JY, Logothetis C, von Eschenbach AC, Batsakis JG, Czerniak B. (1997). Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 17 alterations in human urinary bladder neoplasia. *Oncogene*, 14:2059–2070
- Cheville N. F. (2006). Neoplasia: characterizing the neoplasm. In *Introduction to Veterinary Pathology*. 3rd edition. Blackwell Publishing, Ames, Chapter 8, pp: 169-189.
- Choudhuri S., Arvidson K. e Chanderbhan R. (2007). Carcinogenesis: mechanisms and models. In *Veterinary Toxicology*, Ed. Ramesh C. Gupta. Chapter 22, pp: 343-359.
- Clark I. A. e Dimmock, C. K. (1971). The toxicity of *Cheilanthes sieberi* to cattle and sheep. *Australian Veterinary Journal* 47, 149.
- Claus M. P., Lunardi M., Alfieri A. F., Ferracin L. M., Fungaro, M. H. P. e Alfieri A. A. (2008). Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Veterinary Microbiology* 132: 396–401.
- Cole D. J., Roussel A. J., Whitney M. S. (1997). Interpreting a bovine CBC: collecting and sample and evaluation the erythron. *Vet. Med.* 92(5): 460-468.
- Connolly J. A., Morgan I. M., Jackson M. E. e Campo M. S., (1998) The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from LCR of BPV-4 *Oncogene* 16, 2739-2746.
- Cooper-Driver G. (1976). Chemotaxonomy and phytochemical ecology of bracken. *Bot. J., Linn. Soc.* 73: 35-46.
- Corah L. R. e Ives S. (1991). The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle. *Vet. Clinics Food Animal Practice*, 7: 41-57.
- Cortegio A., Roperto S., Roperto F. e Borzacchiello G. (2009). Molecular pathways underlying bovine papillomavirus-induced urothelial carcinogenesis. *Proceedings of the 27th meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & European College of Veterinary Pathologists (ECVP)*, September 12, 2009, Krakow, pp. 282 (Abstract).
- Cuello C, Correa P, Haenszel W, Gordillo, G.; Brown, C.; Archer, M.; Tannenbaum, S. (1976). Gastric cancer in Columbia. 1. Cancer risk and suspect environmental agents. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57: 1015-20.
- Datta S. C. (1952). Chronic bovine haematuria. *Indian Veterinary Journal*, 29, 187-209.
- Dawra R. K. and Sharma O. P. (2001) Enzootic bovine haematuria - past, present and future. *Veterinary Bulletin* 71, R1-R27.
- De Besnoit B., McLean E., Andersson M., Rogers L. (2008). Iodine deficiency in 2007: Global progress since 2003. *Food and Nutrition Bulletin*, 29 (3): 195-202.
- De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. (2004).

- Classification of papillomaviruses, *Virology*, 324:17–27.
- Decreto Lei 348/85 de 23 de Agosto. Regulamento de Inspeção Sanitária. Diário da República 1ª série, nº 193, 2760:23.
- Dempsey E. C., Newton A. C., Mochly-Rosen D., Fields A. P., Reyland M. E., Insel P. A. e Messing R. O. (2000). Protein kinases C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279: 429-438.
- Dionísio B. A. (1963). Cistite hemorrágica na Ilha da Madeira: algumas considerações. *Serviço Informativo da Junta dos Lacticínios da Madeira*, nº. 77, 1º trimestre, pp:1-5.
- Dobereiner J.; Tokarnia C. H. e Canella C. F. C. (1967). Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* Vol. 2: 489-504.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* 82: 47-95.
- Eastman C. J. & Zimmermann M. B. (2009). The iodine deficiency disorders. www.thyroidmanager.org. Acesso a 02.01.2010.
- Evans W. C. (1976) - Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. *Bot. J. Linn. Soc.* 73: 113-131.
- Evans W. C. (1976). Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 73, 113.
- Evans W. C. (1986). The acute diseases caused by bracken in animals. In *Bracken, ecology, land use and control technology*. Ed. R. T. Smith & J.A. Taylor. Carnforth, Lancashire, Parthenon, pp: 121-132.
- Evans W. C., Evans I. A., Axford R. F., Threlfall, G., Humphreys D. A. e Thomas A. J. (1961). Studies on bracken poisoning in cattle. Part VII – The toxicity of bracken rhizomes. *The Veterinary Record* 73 (35), 852-3.
- Evans W. C., Patel M. C. e Kooby Y (1982). Acute bracken poisoning in homogastric and ruminant animals. *Proc. Royal Soc. Edinburgh*, 81B, 29-64.
- Evans, I. A. (1968). The radiomimetic nature of bracken toxin. *Cancer Res.* 28: 2252-2261
- Evans, I. A. (1986). The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. In *Bracken, ecology, land use and control technology*. Ed. R. T. Smith & J.A. Taylor. Carnforth, Lancashire, Parthenon, pp: 139-146.
- Evans, I. A.; Humphreys, D. J.; Goulden, I; Thomas, A. J.; Evans, W. C. (1963). Effect of bracken rhizomes on the pig. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 73: 229-243.
- Evans, W. C., Evans E. T. R., & Hughes, L. E. (1954c). Studies on bracken poisoning in cattle. III. Field outbreaks of bovine bracken poisoning. *Brit. Vet. J.*, 110: 426-442.
- Evans, W. C., Evans E. T. R., e Hughes, L. E. (1954a). Studies on bracken poisoning in

- cattle. I. *Brit. Vet. J.*, 110: 295-306.
- Evans, W. C., Evans E. T. R., e Hughes, L. E. (1954b). Studies on bracken poisoning in cattle. II. 1950 Bracken poisoning experiments (Lluest Farm). *Brit. Vet. J.*, 110: 265-380.
- Fenwick G. R. (1989). Bracken (*Pteridium aquilinum*) - Toxic effects and toxic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 46, 147.
- Fernandes A. e Fernandes R. B. (1983) – Iconographia Selecta Florae Azorica. Secretaria Regional da Cultura da Região Autónoma dos Açores: 171-181.
- Forjaz G., Pinto C, Carvalho T., e Peleteiro M. C. (2006). Hematúria Enzoótica Bovina na Ilha de São Miguel, Açores. Aspectos macro e microscópicos dos tumores de bexiga. *Medicina Veterinária*, AEFMV, Lisboa, nº 62: 4-12.
- França T. N., Tokarnia, C. H. e Peixoto, P. V. (2002). Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Vol. 22(3):85-96.
- Franco R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes E. M. e Panayiotidis M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutation Research*, 674: 3-22.
- Freitas R. N., O'Connor P. J., Prakash A. S., Shahin e M. Povey A. C. (2001) Bracken (*Pteridium aquilinum*)-induced DNA adducts in mouse tissues are different from the adduct induced by the activated form of the bracken carcinogen ptaquiloside. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 281: 589-594.
- Frish S. M. e Francis H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124: 619-626.
- Frutuoso, G. (1522-1591) – Saudades da Terra, Livro IV, Instituto Cultural de Ponta Delgada, 1998, pp: 196-199.
- Gabriel A.L., Kommers G.D., Masuda E.K., Figuera R.A., Piazer J.V.M., Barros C.S.L., Martins T.B. & Rosa F.B. (2009). Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais nas formas crônicas de intoxicação espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 29(7):515-525.
- Galpin O. P., Whitaker C. J., Whitaker R., e Kassab J. Y. (1990). Gastric cancer in Gwynedd. Possible links with bracken. *British Journal of Cancer*, 61, 737-740.
- Gao N., Jiang B. H., Leonard S. S., Corum L., Zhang Z., Roberts J. R., Antonini J., Zheng J. Z., Flynn D. C., Castranova V. e Shi X. L. (2002). p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU 145 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 45041-45048.
- Gengelbach G. P. e Spears J. W. (1998). Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production and humoral immune responses of calves. *Journal of Dairy Science*, 81: 3286–3292.
- Gooneratne S. R., Buckley W. T. e Christensen D. A. (1989). Review of copper

- deficiency and metabolism in ruminants. *Can. J. An. Sci.*, 69 (4): 819-845.
- Gopalakrishna R. e Jaken S. (2000). Protein kinase C signalling and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**: 1349-1361.
- Goswami P. C. e Singh K. K. (2006). Oxidative stress and multistage carcinogenesis. In *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Ed. Keshav K. Singh. Imperial College Press. Chapter 24: 705-731.
- Goyer R. A. (1991). Toxic effects of metals. In: *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Amdur M. O., Doull J., Klaassen C. D. (Ed.). 4th ed., Pergamon Press, New York, pp: 702-704.
- Grace N. (1994). Managing trace elements deficiencies. AgResearch (New Zealand Pastoral Agricultural Research Institute, Lda. Palmerston North, 1-70.
- Graham T. W. (1991). Trace elements deficiency in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice*, 7 (1): 153-215.
- Grossmann J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis – Anoikis". *Apoptosis*, 7: 247:260.
- Guyot H. e Rollin F. (2007). Le diagnostic des carences de sélénium et iode chez les bovins. *Ann. Méd. Vét.*, **151**, 166-191.
- Guyot H., Saegerman C., Lebreton P., Sandersen S. e Rollin F. (2009). Epidemiology of trace elements deficiencies in Belgian beef and dairy cattle herds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23, 116-123.
- Hannam D. A. R. (1986). Bracken Poisoning in Farm Animals with Special Reference to the North York Moors. In *Bracken, ecology, land use and control technology*. Ed. R. T. Smith & J.A. Taylor. Carnforth, Lancashire, Parthenon, pp: 133-188.
- Harris C. C. (1985). Future directions in the use of DNA adducts as internal dosimeters for monitoring human exposure to environmental mutagens and carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 62:185-191.
- Harvey, J. W. (2000). Microcytic anemias. In *Schalm's Veterinary hematology*, 5th edition. Feldman B. F., Zinkl G. J., Jain, N. C. editors. Lippincott Williams & Wilkins, pp: 200-204.
- Hatama S., Nobumoto K., Kanno T. (2008). Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology* 89, 158–163.
- Heidemann S. R. (2007). Cancer: a disease of cellular proliferation, life span, and death. In *Textbook of Veterinary Physiology*, 4th edition. James G. Cunningham, Bradley G. Klein, pp: 34-57.
- Hirayama T. (1975). Diet and Cancer. *Nutrition and Cancer*.1 (3): 68-81.
- Hirono I. (1990). Carcinogenicity of bracken fern and its causal principle. In *Bracken Biology and Management*. Ed. J.A. Thomson and R.T. Smith. Australian Institute of Agricultural Science, NSW, Occasional Publication n°. 40:233-240.

- Hirono I. (1992). Letter to the editor: Is quercetin carcinogenic? *Japanese Journal of Cancer Research* **83**: 313.
- Hirono I., Aiso, S., Yamaji, T., Mori, H., Yamada, K., Niwa, H., Ojika, M., Wukamatsu, K., Kigoshi, H., Niiyama, K. E Uosaki, Y. (1984^a). Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. *Gann* **75**: 833-836.
- Hirono I., Ito M., Yagyu S., Haga M., Wakamatsu K., Kishikawa T., Nishikawa O., Yamada K., Ojika M. e Kigoshi H. (1993). Reproduction of progressive retinal degeneration (bright blindness) in sheep by administration of 176ptaquiloside contained in bracken. *Journal of Veterinary Medical Science* **55**, 979.
- Hirono I., Kono Y., Takahashi K., Yamada K., Niwa H., Ojika M., Kigoshi H., Niiyama K. E Uosaki Y. (1984c) Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Vet. Record* **115**: 375-378.
- Hirono I., Ogino H., Fujimoto M., Yamada K., Yoshida K., Yoshida Y., Ikagawa M. e Okumura M. (1987). Induction of tumors in ACI rats given a diet containing 176ptaquiloside, a bracken carcinogen. *Journal of the National Cancer Institute* **79**: 1143-1149.
- Hirono I., Shibuya C., Shizmu M. e Fushmi K. (1972). Carcinogenic activity of processed bracken as human food. *Journal of the National Cancer Institute* **48**: 1245.
- Hirono I., Yamada K., Niwa H., Shizuri Y., Ojika M., Hosaka S., Yamaji T., Wakamatsu H., Kigoshi K., Niiyama K. E Uosaki Y. (1984b). Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. *Cancer Letters*, **21**: 239-246.
- Hitt M. E. (1988). Oxygen-Derived Free Radicals: Pathophysiology and Implications. *Compendium on Continuing Education*, 10(8):939-945.
- Ho E., Courtemanche C. e Ames B. N. (2003). Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *Journal of Nutrition*, **133**: 2543–2548.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. e Harris C. C. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science*, **235**, 5015: 49-53.
- Hopkins N. A. (1986). Aetiology of enzootic haematuria. *Vet. Record*. 18(26):715-717.
- Hopkins N. A. (1990). Bracken (*Pteridium aquilinum*): Its distribution and animal health implications. *Br. Vet. J.* **146**: 316-326.
- Howley P. M. e Lowy D. R. (2007). Papillomavirus and their replication. In *Field's Virology*, Knipe D. M. and Howley P. M. (eds). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp: 2200.
- Hussain S. P., Hofseth L. J. e Harris C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews of Cancer*. **3**: 276-285.
- Hwang J. T., Lee M., Jung S. N., Lee H. J., Kang I., Kim S. S. E Ha J. (2004). AMP-activated protein kinase activity is required for vanadate-induced hypoxia-inducible factor 1 alpha expression in DU 145 cells. *Carcinogenesis*, **25**: 2497-2507.

- IARC (1986). Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and some of its constituents. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans*, Vol. 40, *Some naturally occurring substances and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation*, Lyon, pp. 47-65.
- IARC (1995) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 64, *Human Papillomavirus*, IARC, Lyon, France.
- Ito N. (1992). Letter to the editor: Is quercetin carcinogenic? *Japanese Journal of Cancer Research* **83**: 312.
- Jain N. C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger. Philadelphia, pp: 3, 77 e 162.
- Jarrett W. F. H. (1987). Environmental carcinogens and papillomavirus in the pathogens of cancer. *Proceedings of the Royal Society of London* 231, 1.
- Jarrett W. F. H., McNeil P.E., Grimshaw W. T. R., Selman I. E., McIntyre W. I. M. (1978). High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. *Nature* **274**: 215-217.
- Jones M. L. e Allison R. W. (2007). Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet. Clin. Food Anim.* 23:377-402.
- Kadlubar F, Dooley K, Teitel C, Roberts D. W., Benson R. W., Butler M. A., Bailey J. R., Young J. F., Skipper P. W. e Tannenbaum S. R. (1991). Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in Beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Res*, **51**: 4371-7.
- Kamon S. e Hirayama T. (1975). Epidemiology of cancer of the oesophagus in Miye, Nara and Wakayama prefectures with special reference to the role of bracken fern. *Proceedings of the Japanese Cancer Association*, **34**: 211.
- Karunasinghe N., Ryan J., Tuckey J., Masters J., Jamieson M. (2004). DNA stability and serum selenium levels in a high-risk group for prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(3): 391–397.
- Keen C. L. E Graham T. W. (1989). Trace Elements. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed. Kaneko, JJ, 4^a ed., Academic Press, San Diego, pp: 757-766.
- Kim M. K., Park Y. G., Gong G. e Ahn S. H. (2002). Breast cancer, serum antioxidants vitamins, and p53 protein overexpression. *Nutr. Cancer*, **43** (2): 159-166.
- Kito K., Kihana T., Sugita A., Murao S., Akehi S., Sato M., Tachibana M., Kimura S. e Ueda N. (1996). Incidence of p53 and Ha-ras gene mutations in chemically induced rat mammary carcinomas. *Molecular Carcinogenesis* 17(2): 78-83.
- Klaunig J. E. E Kamendulis L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**: 239-267.
- Kleczkowski M., Klucinski W., Bartosz G. (2006). Free radical basics of cattle diseases.

- 1st edition. *The Brothers Waga Lomza Scientific Society*. Lomza. Poland. 105 pp.
- Knobel M. e Medeiros-Neto G. (2004). Moléstias associadas à carência crônica em iodo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 48 (1): 53-61.
- Koss L. G. (1979). Mapping of the urinary bladder: its impact on the concepts of bladder cancer. *Hum. Pathol.* **10**: 533–548.
- Koss L. G., Tiamson E. M. e Robbins M. A. (1974). Mapping cancerous and precancerous bladder changes. A study of ten surgically removed bladders. *Journal of the American Medical Association*, 227 (3): 281-286.
- Kramer J. W., (2000). Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In Schalm's veterinary hematology. 5th edition. Feldman B. F., Zinkl J. G., Jain N. C., Eds. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, pp: 1075-84.
- Kusewitt D. F. e Rush L. J. (2007). Neoplasia and tumor biology. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Ed. M. Donald McGavin e James F. Zachary, 4^a ed., Mosby Elsevier, St. Louis, pp: 253-298.
- Kushida T., Uesugi M., Suguira Y., Kigoshi H., Tanaka H., Hirokawa J., Ojika M. e Yamada K. (1994). DNA damage by ptaquiloside, a potent bracken carcinogen: Detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage products. *Journal of the American Chemical Society*, **116**: 479-486.
- Lacatusu R., Corneliu R., Grigore C., Carstea S. e Ghelase I. (1993). Geochemical and biogeochemical features of areas of haematuria in cattle in the Eastern Carpathian Mountains of Romania. *Environmental Geochemistry and Health*, **1**: 3–15.
- Lawson J. (1989). Bracken derived carcinogens as related to animal health. In *Bracken toxicity and carcinogenicity as related to animal and human health*. Ed. Jim Taylor. Institute of Earth Studies. Bangor, Wales, U.K. nº 44, pp. 35-39.
- Lebreton P., Garnier C. (2006). Endocrinologie de la fonction thyroïdienne chez le ruminant – Influence des facteurs nutritionnels. *N.B.V.C. Explorations fonctionnelles en oligo-éléments*, pp: 1-16.
- Lebreton P., Garnier C., Radigue P. E. (2004). Comment estimer les carences en oligo-éléments chez les bovins. *Livro de Comunicações do III Congresso dos Veterinários da Macaronésia*, pp:1–13.
- Leitão M., Silva L., Illas X. E Rasmussen L. H. (2006). Phenology and annual variation of Ptaquiloside content in bracken (*Pteridium aquilinum*) from São Miguel Island (Azores). *Proceedings of the International Symposium Intractable Weeds & Plant Invaders*. Universidade dos Açores, Ponta Delgada: 16-17.
- Leonard S. S., Harris G. K. e Shi X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Rad. Biol. Medicine*, **37**: 1921-1942.
- Leppert J. T., Shvarts O., Kawaoka K., Lieberman R., Belldgrun A. S., Pantuck A. J. (2005). Prevention of Bladder Cancer: A Review. *European urology*, 49: 226–234.
- Lindahl T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**

(6422):709-15.

- Lioi M. B., Barbieri R., Borzacchiello G., Dezzi S., Roperto S., Santoro A., Russo V., Roperto F. (2004). Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. *Journal of Comparative Pathology*, **131** (2-3): 233-236.
- Lippman S. M., Klein E. A., Goodman P. J., Lucia M. S., Thompson I. M., Ford L. G., Parnes H. L., Minasian L. M., Gaziano J. M., Hartline J. A., Parsons J. K., Bearden J. D. I. I. I., Crawford E. D., Goodman G. E., Claudio J., Winkquist E., Cook, E. D., Karp D. D., Walther P., Lieber M. M., Kristal A. R., Darke A. K., Arnold K. B., Ganz P. A., Santella R. M., Albanes D., Taylor P. R., Probstfield J. L., Jagpal T. J., Crowley J. J., Meyskens F. L. Jr; Baker L. H., Coltman C. A. Jr (2009) Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Journal of the American Medical Association*, 301(1):39-51.
- Lobo M. A. G. (1994). Níveis de Flúor na Água para Consumo Humano do Arquipélago dos Açores. Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores. Angra do Heroísmo.
- London C. A. e Vail D. V. (1996). Tumor biology. In *Small Animal Clinical Oncology*. 2th Edition. Eds., Stephen J. Withrow & E. Gregory MacEwen. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp.16-31.
- Lopez-Illasaca M., Crespo P., Pellici P. G., Gutkind J. S., Wetzker R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, **275** (5289): 394-397.
- Lu L. e Holmgren A. (2009). Selenoproteins *J. Biol. Chem.* **284**: 723-727.
- Maas J. e Smith B. P. (1990). Copper deficiency in ruminants. In "*Large Animal Internal Medicine*", B. P. Smith (Ed.), Mosby Company, St Louis: 829-832.
- Mackenzie S. M. (2005). Fertility: why it is declining and the role of trace minerals to reverse this trend. *Re-defining Mineral Nutrition*, 227-239.
- Majewski S. e Jablonska S. (2009). The impact of animal papillomavirus research development of HPV vaccine. *Proceedings of the 27th meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & European College of Veterinary Pathologists (ECVP)*, September 12, 2009, Krakow, pp: 3-15.
- Marais J. P. (1997). Nitrate and oxalates. In *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Felix D'Mello (ed.) CRC press, Boca Raton: 205-218.
- Marlière C. A., Santos R. C., Galvao M. A. M. e Soares J. F. (1998). Ingestão de broto de samambaia e risco de cancer de esôfago e estômago na região de Ouro Preto, MG. *Revista Brasileira de Cancerologia* **44**(3): 225-229.
- Marlière C. A., Wathern P., Freitas S. N., Castro M. C. F. M., Galvão M. A. M. (2000). Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) consumption and oesophageal and stomach cancer in the Ouro Preto region, Minas Gerais, Brazil. In: *Bracken Fern: Toxicity*,

- Biology and Control. Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999.* Taylor J.A. and Smith R.T. (Eds.) pp. 144-149. Aberystwyth: International Bracken Group. United Kingdom.
- Mayer B. J. (1997). Signal transduction: clamping down on *Src* activity. *Current Biology*, **7**:R295-R298.
- McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D. e Morgan C. A. (1995). Minerals. In *Animal Nutrition*, Fifth edition, Longman, Edinburgh, pp: 97-127.
- McDowell L. R. (2003). Iron. In *Minerals in Animal and Human Nutrition*. 2nd Edition, Chapter 7. Elsevier. Amsterdam, pp. 203-233.
- McKenzie R. A. (1978). Bovine enzootic haematuria in Queensland. *Australian Veterinary Journal* **54**: 61.
- McKenzie R. A. (2007). Bovine enzootic hematuria. In *Veterinary Medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10th Edition, Chapter 33. Ed. Radostits, OM; Gay, CC; Hinchcliff, KW; Constable, PD. Saunders Elsevier, Edinburgh: 1875-1877.
- Mendes H. e Zagalo-Cardoso J. A. (2002). Bócio endêmico em Saúde Pública. *Acta Médica*, **15**: 29-35.
- Miller E. C. e Miller L. A. (1986). Carcinogens and mutagens that may occur in foods. *Cancer* **58**: 1795-1803.
- Moresco E. M. Y. (2006). Abl family kinases in mammalian development. <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/2564>
- Morris D. D. & Large S. M. (1990). Alterations in the leukogram. In Smith B. P., editor. *Large animal internal medicine*. Philadelphia, Mosby, pp: 425-434.
- Morris D. D. e Large S. M. (1990). Alterations in the leukogram. In Smith B. P., Ed. *Large animal internal medicine*. Philadelphia, Mosby, pp: 425-434.
- Morrow M. F. (2000). Bracken as food: a Japanese perspective. In *Bracken fern: toxicity, biology and control*. Proc. of the International Bracken Group Conference. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 204-205.
- Naylor JM e Ralston SL (1991) – The Major Minerals (Macrominerals). In *Large Animal Clinical Nutrition*. Mosby Year Book, St. Louis, pp: 36.
- Niwa H., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Ohba S., Saito Y., Hirono I. e Matsushita, K. (1983b). Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Tetrahedron Letters* **24**, 5371-5372.
- Niwa H., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Ohba S. Saito Y., Hirono I. e Matsushita K. (1983a). Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *Latiusculum*. *Tetrahedron Letters*, **24**: 4117-4120.
- NRC - National Research Council (2001). Nutrients requirements of Dairy Cattle 7^a

- Washington, D.C., National Academic Press, pp: 105–161.
- Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, e Ohta S (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature Medicine*, 13:688-694.
- Ojika, M., Sugimoto, K., Okazaki & Yamada, K. (1989). Modification and cleavage of DNA by ptaquiloside. A new potent carcinogen isolated from bracken fern. *Chemical Society Chemical Communications* 1775-1777.
- Ojika, M., Wakamatsu, K., Niwa, H. & Yamada, K. (1987). Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*: Structure elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with amino acids, nucleosides and nucleotides. *Tetrahedron* 43, 5261.
- Oliveira A. L., Gonçalves M., J., Sobrinho L. G. (1986). Endemic goiter in the island of S. Miguel (the Azores). *Acta Endocrinologica*, 111: 200-203
- Oliveira J. N. B. (1989). A Pastagem Permanente de São Miguel – Açores: Estudo Fitosociológico, Fitoecológico e primeira abordagem do ponto de vista agrônomo. Tese de Doutorado. Universidade dos Açores: 336-339.
- Olson C. (1987). Animal papillomas: historical perspectives. In Salzman NP, Howley PM (eds). The Papovaviridae. Vol. 2 *The Papillomavirus*. Plenum Press, New York: 39-66.
- Olson C., Pamukcu A. M., Brobst D. F. (1965). Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumours. *Cancer Research*, 25:840-847.
- Olson C., Pamukcu A. M., Brobst D. F., Kowalczyk T., Satter E. J., Price J. M. (1959). A urinary bladder tumour induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Research*, 19:779-783.
- Otten N., von Tschärner C., Lazary S., Antczak D. F., Gerber H. (1993). DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Archives of Virology*, 132: 121-131.
- Oyasu R, Hirao Y and Izumi K. Enhancement by Urine of Urinary Bladder Carcinogenesis. *Cancer Res* 1981; 41: 478-81.
- Ozkul I. A. e Aydin Y. (1996). Tumours of the urinary bladder in cattle and water buffalo in the Black Sea region of Turkey. *Br. Vet. J.*, 152, 473-475.
- Page C. N. (1976). The taxonomy and phytogeography of bracken – a review. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 73: 1-34.
- Page C. N. (1986). The Strategies of Bracken as a Permanent Ecological Opportunist. In Bracken, ecology, land use and control technology. Ed. R. T. Smith & J.A. Taylor. Carnforth, Lancashire, Parthenon, pp: 173-181.
- Pamukcu A. M., Price, J. M. e Bryan, G. T. (1976). Naturally Occurring and Bracken-Fern-Induced Bovine Urinary Bladder Tumours. Clinical and Morphological

- Characteristics. *Vet. Pathol.* **13**: 110-122.
- Pamukcu AM (1974) – Tumors of the Urinary Bladder. Bulletin of the World Health Organization, **50**: 43-52.
- Pamukcu, A. M. & Price, J. M. (1969). Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Journal of the National Cancer Institute* **43**, 275.
- Pamukcu, A. M., Erturk, E., Yalciner, S., Milli, U. & Bryan, G. T. (1978). Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research* **38**, 1556.
- Pamukcu, A. M., Goksoy, S. K. & Price, J. M. (1967). Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Research* **27**, 917.
- Pamukcu, A. M., Yalciner, S., Hatcher, J. F. & Bryan, G. T. (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*) *Cancer Research* **40**, 3468-3472.
- Papp L. V., Lu J, Holmgren A, Khanna K. K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants Redox Signalling*. 9:775-806.
- Parkin M. D., Bray F., Ferlay J. & Pisani P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clinical*, 55: 74-108; doi: 10.3322/Canjclin.55.2.74.
- Patrick, L. (2008). Iodine: deficiency and therapeutic considerations. *Altern. Med. Rev*, 13(2): 116-127.
- Pereira M. J. (1993). Da composição florística das pastagens à apreciação do seu valor nutritivo: contribuição para o estudo das pastagens permanentes da ilha de São Miguel. Tese de Mestrado. Universidade dos Açores. Departamento de Biologia, Ponta Delgada: 323 pp.
- Perez-Alenza M. D., Blanco J., Sardon D., Moreiro, M. A. S., Rodríguez-Bertos A., Sánchez B, Pizarro M., Mazzucchelli F. & Peña L. (2006). Clinico-pathological findings in cattle exposed to chronic bracken fern toxicity. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(4), 185-192.
- Pfister H. (1987). Papillomaviruses: general description, taxonomy and classification. In Salzman NP, Howley PM (eds.). *The Papovaviridae*. Vol. 2 *The Papillomavirus*. Plenum Press. New York: 1-38.
- Pinto C. A., Alves A., Pires M., Almeida J., Azevedo, J. (1995) Intoxicação crónica pelo cobre: Uma realidade a considerar na formulação alimentar. *Revista Portuguesa de Zootecnia* 2 (2): 1-14.
- Pinto C. A., Louzã A. C., Almeida V., Melo M., Vaz Y., Peleteiro M. C. e Smith B. L. (2001a). Caracterização epidemiológica da ocorrência de tumores da bexiga em populações de bovinos leiteiros da ilha de São Miguel. *Revista Portuguesa de*

- Pinto C. A., Peleteiro M. C., Lobo M. A., Machado J. e Silva L. (2007). Intoxicação aguda pelo feto comum [*Pteridium aquilinum* (L.) Kühn] em bovinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 102 (563-564) 289-298.
- Pinto C. Aranha, P. e Viana J. (2007) – Carências em oligoelementos em bovinos dos Açores e Avaliação do efeito da administração de oligoelementos no crescimento de novilhos. Comunicação oral no 7º Encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Peniche, 24 e 25 de Novembro de 2007.
- Pinto C. e Lobo A. (2000). Intoxicação por nitratos em bovinos. *O Médico Veterinário*, 65:29-33.
- Pinto C., Januário, T., Geraldês, M., Machado, J., Lauren, D. R., Smith B. L., Robinson, R. C. (2004). Bovine Enzootic Haematuria on São Miguel Island – Azores. *Poisonous Plants and Related Toxins*. Ed. T. Acamovic, C.S. Stewart e T.W. Pennycott. CABI Publishing. Wallingford, U.K. Chapter 85, 564-574.
- Pinto C., Lima R., Louzã A. C., Almeida V., Melo M., Vaz Y., Neto-Fonseca I., Lauren D. R., e Smith B. L. (2000). Bracken fern induced bovine enzootic haematuria in São Miguel Island, Azores. In *Bracken fern: toxicity, biology and control. Proc. of the International Bracken Group Conference*. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 136-140.
- Pinto C., Medeiros F., Alves A., Pires M., Rodrigues P., Vala H., Seixas F., Durão F., Peleteiro C., Peña L., Sanchez B. (1996a). Cattle Neoplasias on São Miguel Island – Azores. *Proceedings of the XIX World Buiatrics Congress. BCVA Edinburgh*. 3º Vol.: 91-92.
- Pinto C., Medeiros F., Alves A., Pires M., Rodrigues P., Vala H., Seixas F., Durão F., Peleteiro C., Peña L., Sanchez B. (2001b). Neoplasias em bovinos de São Miguel – Açores. II- Estudo anatomohistopatológico. *Veterinária Técnica* 11 (1): 44-48.
- Pinto C., Medeiros F., Alves A., Pires M., Rodrigues P., Vala H., Seixas F. Durão F., Peleteiro M. C. Peña L. E Sanchez B. (1996). Cattle neoplasias on São Miguel Island (Azores). *Proceedings XIX World Buiatrics Congress. BCVA Edinburgh*, 3rd vol, 91-92.
- Pinto C., Medeiros F., Freitas F., Cabral A., Oliveira V. e Rebimbas F. (1996b). Neoplasias em bovinos de S. Miguel- Açores. I - Estudo retrospectivo e situação actual. *Veterinária Técnica*, 6 (1): 30-37.
- Pinto C., Medeiros F., Geraldês M., Flor L., Garrett F., Benevides S., Santos V., Pinheiro I., Canada N., Rocha A. E Correia da Costa J. M. (2003). Investigação de focos de aborto em bovinos leiteiros da ilha de São Miguel, Açores. *IV Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Las Palmas, Gran Canária. Julho de 2003.
- Pinto C., Viana J. e Aranha P. (2008). Trace element deficiency in the Azorean cattle:

- an animal production, health and economical constraint. *Proceedings of the XXV World Buiatrics Congress*, Budapeste, Hungria, 6 - 11 de Julho de 2008, pp.39-40.
- Plumlee K. H., Johnson B., Galey F. D. (1998). Disease in cattle dosed orally with oak or tannic acid. In *Toxic plants and other natural toxicants*. Editors: Garland, T, Barr, AC. CAB Abstracts database. CAB International.
- Polyak K., Xia Y., Zweier J. L., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389(6648):
- Portaria n.º 26/2007 de 26 de Abril de 2007. Secretaria Regional da Agricultura e Florestas da Região Autónoma dos Açores.
- Portaria nº 7/95 de 16 de Fevereiro. Secretaria Regional de Agricultura e Pescas da Região Autónoma dos Açores
- POSEI vacas leiteiras (2007) <http://www.posei.azores.gov.pt>
- POSEIMA Programa de Opções Específicas para o Afastamento e Insularidade da Madeira e Açores; Regulamento CEE n.º 1600/92 do Conselho de 15 de Junho de 1992 Regulamento (CE) n.º 1453/2001 do Conselho de 28 de Junho de 2001.
- Povey A. C., Evans I. A., Taylor J. A. e O'Connor P. J. (1994). Detection of DNA Adducts by 32P-postlabelling in Mice Treated with Bracken Extract and Bracken Spores. In *Bracken: an Environmental Issue*. Eds. RT Smith & JA Taylor. International Bracken Group. Aberystwyth. Special Publication nº 2: 95-98.
- Povey A. C., Potter D. e O'Connor P. J. (1996). ³²P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the upper gastrointestinal tissue of mice fed bracken extract or bracken spores. *British Journal of Cancer* **74**: 1342-1348.
- Prakash A. S., Pereira T. N., Smith B. L., Shawand G. e Seawright A. A. (1996). Mechanism of bracken fern carcinogenesis: Evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Natural Toxins*, **4**: 221-227.
- Price J. M. e Pamukcu A. M. (1968). The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Cancer Research* **28**, 2247-2251.
- PRORURAL (2007). Programa de Desenvolvimento Rural da Região Autónoma dos Açores (2007-2013). <http://prorural.azores.gov.pt/>.
- Raisbeck M. F. (2000). Selenosis. *Vet. Clin. North Amer. Food An. Practice*, **16**(3): 465-480.
- Rao A., Luo C., Hogan P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Ann. Rev. Immunol.* **15**: 707-47.
- Rasmussen L. H., Jensen L. S. e Hansen, H.C. (2003). Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *Journal of Chemical Ecology* **29** (3): 771-778.
- Rasmussen L. J. (2006). Oxidative damage to DNA and its repair. In *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Ed. Keshav K. Singh. Imperial College Press. Chapter 7: 253-

- Rayman M. P. (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, **64**: 527–542.
- Regulamento (CE) n.º 247/2006, do Conselho, de 30 de Janeiro de 2006.
- Resendes A. R., Roperto S., Trapani F., Urraro C., Roperto F., Borzacchiello G. (2010). Association of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and urinary bladder tumours in cattle from the Azores archipelago. *Res. Vet. Sci.*, doi:10.1016/j.rvs.2010.02.001.
- RGA - Recenseamento Geral da Agricultura (1999). Instituto Nacional de Estatística, Lisboa & Serviço Regional de Estatística dos Açores, Angra do Heroísmo.
- Robinson R. C. (1999). Bracken clearance. *ENACT* 7(2), 10-13.
- Robinson R. C. (2000a). Control of Bracken-induced Haematuria in Cattle: Visit to São Miguel, July 2000. *IATG Report 2000-09*. Aventis CropScience.
- Robinson R. C. (2000b). The means to large-scale, effective bracken clearance in the UK. *Bracken fern: toxicity, biology and control. Proc. Of the International Bracken Group Conference*. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 156-162.
- Robinson R. C. (2006). Bracken management to control BEH in the Azores. *Proceedings of the International Symposium Intractable Weeds & Plant Invaders*. Universidade dos Açores, Ponta Delgada: 17.
- Rollin F. (2002). Mise en évidence des carences en oligo-éléments dans les exploitations bovines. *Livro de Comunicações do Congresso de Ciências Veterinárias 2002*, 95–106.
- Roperto S., Borzacchiello G., Brun R., Leonardi L., Maiolino P., Martano M., Paciello O., Papparella S., Restucci B., Russo V., Salvatore G., Urraro C., Roperto F. (2009). A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. *J. Comp. Path.*, doi:10.1016 / j.jcpa.2009.08.156
- Roskoski R. Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**(4): 1155-64 (Abstract), <http://www.ncbi.gov.nlm.nih.gov/pubmed/15504335>
- Rous P. e Kidd J. G. (1940). The activating, transforming, and carcinogenic effects of the rabbit papillomavirus (Shope) upon implanted tar tumours. *The Journal of Experimental Medicine*, 7: 787-812.
- Sadler T. W. (2003). *Langman's Medical Embryology*. 9th edition. Lippincott, Williams & Wilkins, pp: 321-336.
- Saito K., Nagao T., Matoba M., Koyama K., Natori S., Murakami T. E Saiki Y. (1989). Chemical assay of ptaquiloside, the carcinogen of *Pteridium aquilinum*, and the distribution of related compounds in the Pteridaceae. *Phytochemistry*, **28**: 1605.
- Saito K., Nagao T., Takasuki S., Koyama K. E. e Natori S. (1990). The sesquiterpenoid carcinogen of bracken fern, and some analogs, from the Pteridaceae. *Phytochemistry*, **29**: 1475.

- Sampaio J. (2006). A agricultura insular: alguns apontamentos sobre a sua história. 27.^a *Reunião de Primavera da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens*. Ponta Delgada, pp.1-14.
- Santos R. C. (1990). Considerações sobre o uso do broto de samambaia na alimentação humana. *Ciência e Cultura (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência)*, **42**(3/4): 216-219.
- Santos R. C. S., Lindsey C. J., Ferraz O. P., Pinto J. R., Mirandola R. S., Benesi F. J., Birgel E. H., Pereira C. A. B., Beçak W. (1998). Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *Journal of General Virology*, **79**: 2127-2135.
- Sardon D., de la Fuente I., Calonge E., Perez-Alenza M. D., Castano M., Dunner S., Pena L. (2005). H-ras immunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. *Journal of Comparative Pathology*, **132** (2-3): 195-201.
- Schrauzer G. N. (2001). Nutritional Selenium Supplements: Product Types, Quality, and Safety. *Journal American College of Nutrition*, **20** (1): 1–4.
- SEER (Surveillance Epidemiological and End Results) program (2007). Multiple primary and histology coding rules. *National Cancer Institute*, Bethesda, MD.
- Shahin M., Moore M. R., Smith B. L., Worrall S., Seawright A. A. e Prakash, A. S. (1998c). H-ras activation is an early event in ptaquiloside –induced carcinogenesis: Comparison of acute and chronic toxicity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **250**: 491-497.
- Shahin M., Seawright A. A., Smith B. L. and Prakash A. S. (2000b). Molecular mechanism of bracken carcinogenesis. In: *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control. Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999*. Taylor, J.A and Smith, R.T. (Eds.). Special Publication No.4: 91-95.
- Shahin M., Smith B. L., Prakash A. S. (1999). Bracken carcinogenesis and human diet. *Mutation Research*, **443**: 69-79.
- Shahin M., Smith B. L., Worrall S., Moore M. R., Seawright A. A. e Prakash A. S. (1998a). Bracken fern carcinogenesis: Multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF α levels and mammary gland carcinoma in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 192-197.
- Shahin M., Smith, B. L., Oelrichs P. B., Moore M. R., Worrall S., Seawright A. A. e Prakash A. S. (1998b). Induction of mammary gland carcinoma, monocytosis and type II pneumocyte proliferation by activated ptaquiloside. In *Toxic Plants and Other Natural Toxicants*, T. Garland and A. C. Barr (Eds.) Wallingford, UK: CAB International, pp. 329-333.
- Sibbet G., Romero-Graillet G., Meneguzzi. G. e Campo M. E. (2000). α -6 integrin is not

- the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *Journal of General Virology*, **81**: 327–334
- Silva L. F. D. (2001). Plantas vasculares invasoras no Arquipélago dos Açores. Caracterização geral e estudo de um caso: *Clethra arborea* Aiton (Cletheraceae). Dissertação apresentada à Universidade dos Açores para a obtenção do grau de Doutor na Área de Biologia, Especialidade de Ecologia Vegetal. Universidade dos Açores. Ponta Delgada, 541 pp.
- Silva L. F. D. (2008). Comunicação pessoal. Centro de Conservação e Protecção do Ambiente da Universidade dos Açores. Departamento de Biologia. Ponta Delgada.
- Silverman D., Devesa S., Moore L. e Rothman N. (2006). Bladder Cancer. In: Schottenfeld D and Fraumeni JF Jr., eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*, 3rd Edition. New York: Oxford University Press; p. 1113.
- Simeonova P. P. e Luster, M. I. (2002). Arsenic carcinogenicity: relevance of c-Src activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **234/235**: 277-282.
- Simeonova P. P., Wang S., Hulderman T. e Luster M. I. (2002). C-Src activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway by arsenic. Role in carcinogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 4:2945-2950.
- Singh R. P., Joshi H. C. & Kumar M. (1987). Experimental bracken fern toxicity in calves – changes in blood and urine. *Indian J. Vet. Med.* **7**, 2: 96-100.
- Slupphaug G., Kavli. B., Krokan H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research* **531**:231-251.
- Smith B. L. (1990). Bracken fern and animal health in Australia and New Zealand. In *Bracken Biology and Management*. Eds. Thomson, J.A. & Smith R.T. Australian Institute of Agricultural Science, Sydney, 241-246.
- Smith B. L. (1990). Bracken fern and animal health in Australia and New Zealand. In *Bracken Biology and Management*. Eds. J. A. Thompson & R. T. Smith. Australian Institute of Agricultural Science. Occasional Publication nº 40: 227-231.
- Smith B. L. (1997). The toxicity of bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. In *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Felix D'Mello (ed.) CRC press, Boca Raton: 63-76.
- Smith B. L. (2004). Bracken fern (genus *Pteridium*) toxicity – a global problem. In *Poisonous Plants and Related Toxins*. Ed. T. Acamovic, C.S. Stewart e T.W. Pennycott. CABI Publishing. Wallingford, U.K. Chapter 35:227-240.
- Smith B. L. e Beatson, N. S. (1970) Bovine enzootic haematuria in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* **18**, 115-120.
- Smith B. L. E Pinto C. A. (2006). Bracken (genus *Pteridium*) and its carcinogen, ptaquiloside as a worldwide cause of animal health problems. *Proceedings of the International Symposium Intractable Weeds & Plant Invaders*. Universidade dos

Açores, Ponta Delgada: 13-14.

- Smith B. L., Embling P. P., Lauren D. R. e Agnew M. P. (1992). Carcinogenicity of *Pteridium esculentum* and *Cheilanthes sieberi* in Australia and New Zealand. In: *Poisonous Plants. Proceedings of the Third International Symposium*. Eds: James, L.F., Keeler, R.F., Bailey, E.M., Cheeke, P.R. & Hegarty, M.P. Iowa State University Press, 448.
- Smith B. L., Embling P. P., Lauren D. R., Agnew M. P., Ross A. D. e Greentree, P. L. (1989). Carcinogen in rock fern (*Cheilanthes sieberi*) from New Zealand and Australia. *Australian Veterinary Journal* 66 (5):154-155.
- Smith B. L., Embling, P. P., Agnew, M. P., Lauren, D. R. e Holland, P. T. (1988). Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium esculentum*) in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 36, 56-58.
- Smith B. L., Lauren D. R. e Prakash A. (2000). Bracken fern (*Pteridium*): toxicity in animal and human health. In *Bracken fern: toxicity, biology and control. Proc. of the International Bracken Group Conference*. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 76-85.
- Smith B. L., Lauren D. R., Embling P. P. e Agnew M. (1993). Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium* spp.) in relationship to grazing ruminants. In: *Proceedings of the 17th International Grassland Congress*. Eds. Broughan, J. *New Zealand Grassland Association*, 1396.
- Smith B. L., Lauren D. R., Embling P. P., Agnew M. (1993). Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium* spp.) in relationship to grazing ruminants. *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*. Palmerston North, New Zealand.
- Smith B. L., Seawright A. A. (1995). Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health – A brief review, *Natural Toxins*, 3: 1-5.
- Smith B. L., Seawright A. A., Ng J. C., Hertle A., T., Thomson J. A. e Bostock, P. D. (1994a). Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (*Pteridium* spp.), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia. *Natural Toxins* 2, 347.
- Smith B. L., Shaw G., Prakash A. S. e Seawright A. A. (1994b). Studies on DNA formation by ptaquiloside, the carcinogen of bracken ferns (*Pteridium* spp.). In: S. M. Colegate and P. R. Dorling (Eds.), *Plant Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects*, Wallingford, UK: CAB International, pp. 167-172.
- SNIRA - Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (2007). Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. URL: <http://www.ifap.min-agricultura.pt>.
- Souici A. C., Mirkovitch J., Hausel P., Keefer L. K. e Felley-Bosco E. (2000). Transition mutation in codon 248 of the p53 tumor suppressor gene induced by reactive

- oxygen species and a nitric oxide-releasing compound. *Carcinogenesis*, **21**: 281-287.
- Spiess P. E. e Czerniak B. (2006). Dual-track pathway of bladder carcinogenesis. Practical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med*, 130: 844-852.
- SREA (1998). Azores in Figures (1992-97), DREPA, 11/98, Angra do Heroísmo: 57 pp.
- Stoewsand G. S., Anderson J. L., Boyd J. N., Hrazdina G., Babish J. G., Walsh, K. M. e Losco, P. (1984). Quercetin: a mutagen, not a carcinogen, in Fischer rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **14**: 105.
- Sugimura T. (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* **21** (3):387-395.
- Sun Y., Oberley L. W. (1996). Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic. Biol. Med.*, **21** (3): 335-48.
- Sunderman F. M. (1987). Bracken poisoning in sheep. *Australian Veterinary Journal* **64**, 25.
- Surai P. F. (2002). Antioxidant systems in the animal body. *Natural Antioxidants in the Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham University Press, UK, pp 1 – 19.
- Surai P. F. (2005). Minerals and anti-oxidants. In *Re-defining Mineral Nutrition*, Nottingham University Press, UK, 147–178.
- Surai P. F. (2006). Selenium and human health. In *Selenium in nutrition and health*. Nottingham University Press, UK, pp 643–808.
- Surai P. F., Fisinin V. I., Papazyan T. T. (2008). Selenium deficiency in Europe: causes and consequences. In *Current advances in selenium research and applications*. Vol. 1. Ed. Peter F. Surai, Jules A. Taylor-Pickard. Wageningen Academic Publishers, pp.13-44.
- Tan J., Zhu W., Wang W., Li R., Hou S., Wang D., Yang L. (2001). Selenium in soil and endemic diseases in China. *The Science of the Total Environment* **284**: 227-235.
- Taylor J. A. (1986). The Bracken Problem: A Local Hazard and Global Issue. In *Bracken, ecology, land use and control technology*. Ed. R. T. Smith & J. A. Taylor. Carnforth, Lancashire, Parthenon, pp: 21-42.
- Taylor J. A. (1990). The bracken problem: A global perspective, In *Bracken Biology and Management*. Thomson, J.A, and Smith, R.T (Eds.): The Australian Institute of Agricultural Science, 40: 3-20.
- Taylor J. A. e Smith R. T. (1994). Bracken 2000 and Beyond. In *Bracken: an Environmental Issue*. Eds. R. T. Smith & J. A. Taylor. International Bracken Group. Aberystwyth. Special Publication nº 2: 214-224.
- Thannickal, V. J. e Fanburg, B. L., (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**:L1005-L1028.
- Theophanides T. e Anastassopoulou J. (2006). Copper and carcinogenesis. In *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Ed. Keshav K. Singh. Imperial College Press. Chapter 28: 807-820.

- Thomson J. A. (2000). New perspectives on taxonomic relationships in *Pteridium*. *Bracken fern: toxicity, biology and control*. Proc. of the International Bracken Group Conference. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 15-34.
- Tokarnia C. H. Dobereiner J. E Canella C. F. C. (1967). Ocorrência da intoxicação aguda pela “Samambaia” (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* Vol. 2: 329-336.
- Tokarnia C. H., Dobereiner J. e Canella C. F. C. (1976). As mais importantes plantas tóxicas do Brasil. Folheto vulgarizador do UFRRJ – EMBRAPA / RJ – GEPA / RJ, MA.
- Tomita Y., Literak I., Ogawa T., Jin Z., Shirasawa H. (2007). Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from European bison. *Virus Genes*, 35:243–249.
- Tomlinson D. J., Mülling C. H., Fakler T. M. (2004). Formation of keratins in the bovine claw: Roles of hormones, minerals and vitamins in functional claw integrity. *Journal of Dairy Science*, 87: 797–809.
- Toste J. M. (1953). Doença da Volta ou Tomadiço na Ilha de São Miguel, Açores. Relatório de Tese de Licenciatura em Medicina Veterinária, pp:16 – 23.
- Toyokuni S. (2006). Iron-induced carcinogenesis. In *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Ed. Keshav K. Singh. Imperial College Press. Chapter 27: 789-805.
- Tvedten H., Weiss D. J. (2000). Classification and laboratory evaluation of anemia. In *Schalm's Veterinary hematology*. 5th edition. Feldman BF, Zinkl GJ, Jain NC editors. Lippincott Williams & Wilkins, pp: 143-150.
- Underwood E. J., Suttle N. F. (1999a). Copper. *The Mineral Nutrition of Livestock* 3^a Ed, CABI, Wallingford, pp: 283 – 342.
- Underwood E. J., Suttle N. F. (1999b). Selenium. *The Mineral Nutrition of Livestock* 3^a Ed, CABI, Wallingford, pp: 421 – 475.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncola J., Izakovic M., Mazura M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- Van der Hoeven J. C. M., Lagerweig W. J., Posthumus M. A., Van Veldhuizen A., Holterman H. A. J. (1983). Aquilide A, a New Mutagenic Compound Isolated from Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Carcinogenesis* 4: 1587-1590.
- Veitch B. (1990). Aspects of Aboriginal use and manipulation of bracken fern. In *Bracken Biology and Management*. (Eds.) Thomson, J.A. & Smith, R.T. Australian Institute of Agricultural Science, Sydney, 215-226.
- Verlander J. W. (2007). Acid-base balance. In *Textbook of Veterinary Physiology*, 4th edition, James G. Cunningham & Bradley G. Klein (Ed.) Saunders, Elsevier, St. Louis, chapter 44, pp:559.
- Villalobos-Salazar J., Hernandez H., Meneses A. e Salazar G. (2000). Factors which

- may affect ptaquiloside levels in milk: Effects of altitude, bracken growth stage and milk processing. In *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control*. Taylor, J A and Smith R.T. (Eds.). Proceedings of the International Bracken Group Manchester 1999. 4th International Bracken Conference, University of Manchester pp: 68-75.
- Villalobos-Salazar J., Meneses A. E Salas J. (1990). Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on bracken fern, *Pteridium aquilinum*. In: *Bracken Biology and Management*. (Eds.) Thomson, J.A. & Smith, R.T. Australian Institute of Agricultural Science, Sydney, 247-251.
- Villalobos-Salazar J., Meneses A., Rojas J. L., Mora J., Porras R. E., Herrero M. V. (1989). Bracken derived carcinogens as affecting animal health and human health. In *Bracken Toxicity and Carcinogenicity as related to animal and human health*. Eds. Jim Taylor. Institute of Earth Studies. Bangor. Wales, U.K. nº. 44: 40-51.
- Villalobos-Salazar J., Mora J., Meneses A. E Pashov B. (1995). The carcinogenic effects of bracken spores. In *Bracken: An Environmental Issue*. Eds. Smith, R.T. & Taylor J.A. International Bracken Group, Aberystwyth. 102.
- Villalobos-Salazar J., Mora J., Meneses A., Pashov B. (1994). The carcinogenic effects of bracken spores. In *Bracken: an Environmental Issue*. Eds. R. T. Smith & J. A. Taylor. International Bracken Group. Aberystwyth. Special Publication nº 2: 102-103.
- Vinceti M., Wei E. T., Malagoli C., Bergomi M. e Vivoli G. (2001). Adverse health effects of selenium in humans. *Rev. Environ. Health*, **16**(4): 233-251.
- Vousden K. H., Ryan K. M. (2009). p53 metabolism. *Nature Reviews Cancer*, **9** (10): 691-700.
- Wang S. W. e Shi X. L. (2001). Mechanisms of Cr(VI)-induced p53 activation: the role of phosphorylation, mdm2 and ERK. *Carcinogenesis*, **22**: 757-762.
- Wang Z. e Goonewardene L. A. (2004). The use of Mixed models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science* **84**, 1 –11.
- Watson A. D. J. & Canfield P. J. (2000). Nutritional deficiency anemias. In Schalm's veterinary hematology. 5th edition. Feldman B. F., Zinkl J. G., Jain N. C., Eds. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, pp: 190-195.
- Watson W. A., Barnett K. C. e Terlecki S. (1972a). Progressive retinal degeneration (Bright Blindness) in sheep: A review. *The Veterinary Record* **91**, 665.
- Watson W. A., Terlecki S., Patterson D. S. P., Sweasey D., Herbert C. N. e Done J. T. (1972b). Experimentally produced progressive retinal degeneration (Bright Blindness) in sheep. *British Veterinary Journal* **128**, 457.
- Whanger P. D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*, **91**: 11–28
- Wilmans O. e Rasbach H. (1973). Observations on the Pteridophytes of São Miguel,

- Açores. *Br. Fern Gaz.* **10**: 315-29.
- Wosiacki S. R., Barreiro M. A. B., Alfieri A. F., Alfieri A. A. (2005). Semi-nested PCR for detection and typing of bovine *Papillomavirus* type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of Virological Methods* **126**: 215–219.
- Xu L. R. (1992). Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. *Res. Vet. Science* **53**: 116-121.
- Yamada K., Ojika M. e Kigoshi H. (2007). Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Natural Products Reports*, 24:798 – 813.
- Zhong H., De Marzo A. M., Laughner M., Lim M., Hilton D. A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W. B., Semenza G. L. e Simons J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* **59**: 5830-5835.
- Zhuo P. e Diamond A. M. (2009). Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Bioch. Biophys. Acta*. Doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.004.
- Zimmerman M. B. (2009). Iodine deficiency. *Endocrine Reviews*, 30: 376-408.
- zur Hausen H. (1996). Papillomaviruses infections – a major cause of human cancers. *Biochem. Biophysics Acta. Rev. Cancer*, 1288, F55-F78.
- zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews*, 2:342-350.
- zur Hausen H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancer- a brief historical account. *Virology*, 384:260-265.
- Zwick, E., Bange, J., Ulrich, A. (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*, **8**:161-173.

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO para RECOLHA de DADOS



**HEMATÚRIA ENZOÓTICA
SÃO MIGUEL - AÇORES**



Projecto POCTI/1999/CVT/34320

Inquérito Nº _____ Data Visita: ____ / ____ / 2003

1. IDENTIFICAÇÃO do PRODUTOR e da EXPLORAÇÃO

Nº EXPLORAÇÃO: _____
Nome do Produtor: _____
Nº telefone: _____

2. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA EXPLORAÇÃO

Código INGA: _____	Total de SAU
(declarado): _____ ha	
Nº Blocos SAU (declarados): _____	Área ≈ Bloco/SAU
(declarado): _____ ha	

3. DISPONIBILIDADES FORRAGEIRAS DA EXPLORAÇÃO

ÁREA TOTAL de <u>PASTAGEM</u> :	_____ alq	
ÁREA de CULTURAS p/ <u>SILAGEM</u> ?	_____ alq	
TIPO de CULTURA(s)? _____	Altitude: (<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta) _____ %	
_____	Altitude: (<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta) _____ %	
_____	Altitude: (<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta) _____ %	
ÁREA de CULTURAS p/ <u>FENO</u> ?	_____ alq	
TIPO de CULTURA(s)? _____	Altitude: (<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta) _____ %	
_____	Altitude: (<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta) _____ %	
_____	Altitude: (<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta) _____ %	

4. DIMENSÃO e ESTRUTURA da MANADA (SNIRB)

CABEÇAS	2002	
	FÊMEAS	MACHOS
Até 6 meses		
6 a 12 meses		
12 a 24 meses		
+ 24 meses		
VACAS		
<i>Outras Vacas</i>		
TOTAL		

4. PRODUÇÃO de LEITE

Método de Ordenha? _____ (MÓvel, SAla, OUtro)

Total de leite comercializado: _____ (t/ano)

FORAM IMPORTADAS REPRODUTORAS nos Anos 90? ☐ (Sim, Não) Caso afirmativo,

Ano _____	País _____	Nº Fêmeas _____
Ano _____	País _____	Nº Fêmeas _____
Ano _____	País _____	Nº Fêmeas _____
Ano _____	País _____	Nº Fêmeas _____
Ano _____	País _____	Nº Fêmeas _____

6. HEMATÚRIA ENZOÓTICA dos BOVINOS

DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS :

Nº de Casos de HEB: _____ Ano de Detecção: _____

Nº de Casos de HEB: _____ Ano de Detecção: _____

TUMORES DETECTADOS (Matadouro nos últimos 7 anos):

nº _____

GUEIXAS, idade ≤ 12 meses

DADOS relativos às **PASTAGENS**

FOLHA 1:	ÁREA _____ alq	DESIGNAÇÃO _____
ESTIMATIVA \approx NITRATOS no SOLO? _____ (sacas/ano/alq) adubo _____ (sacas/ano/alq) salitre		
Tipo Pastagem? _____	Altitude: <input type="checkbox"/>	(<u>B</u> aixa, <u>M</u> édia, <u>A</u> lta)
Acesso à alimentação: <input type="checkbox"/>	(<u>P</u> astagem <u>L</u> ivre; <u>P</u> resas à <u>E</u> staca; estabulação <u>E</u>)	
Há práticas de Desbaste dos Fetos? <input type="checkbox"/>	(<u>S</u> im, <u>N</u> ão)	
Há aplicação de herbicidas? <input type="checkbox"/>	(<u>S</u> im, <u>N</u> ão) Tipo de herbicida? _____	
Grau Infestação <i>Pteridium sp</i> ? <input type="checkbox"/>	(<u>AU</u> sente, <u>PR</u> esente <u>BA</u> rreiras, <u>P</u> resente <u>P</u> asto, Presente <u>B</u> arreiras e <u>P</u> asto)	
Estimativa de infestação <i>Pteridium sp</i> até 10% <input type="checkbox"/>	10 a 20% <input type="checkbox"/>	> de 20% <input type="checkbox"/>
Sinais de herbivoria de <i>Pteridium sp</i> ? <input type="checkbox"/>	(- / + / ++ / +++)	

DADOS relativos à DIETA COMPLEMENTAR

INGEREM COLOSTRO MATERNO? ☐ (Sim, Não)

INGEREM LEITE do “*COLECTIVO*”? ☐ (Sim, Não)

QUANTIDADE de CONCENTRADO do Nascimento até Desmame? ____ (sacas/dia)

DÁ SUPLEMENTOS ao GRUPO? ☐ (Sim, Não)

caso afirmativo, qual a frequência de oferta? _____ / gueixa / ano (BLocos, BAldes, Cilindros, Outros)

DÁ “BALAS” ao GRUPO? ☐ (Sim, Não)

caso afirmativo, qual a frequência de oferta? _____ “balas” / gueixa / ano

CONFORMAÇÃO CORPORAL DAS GUEIXAS É “HETERÓGENEA”? ☐ (Sim, Não)

DESVIOS do ESTADO de SAÚDE

Nº GUEIXAS com sinais de acromotriquia? _____ dia da visita

Nº GUEIXAS com PAPILOMAS? _____ dia da visita

Localização dos Papilomas? _____

Nº INTOXICAÇÕES AGUDAS? _____ / 2002

Nº MORTES (Hematúria/Intoxicação)? _____ / 2002

GUEIXAS, idade > 12 meses

e

VACAS SECAS

DADOS relativos às **PASTAGENS**

FOLHA 1 : ÁREA _____ alq DESIGNAÇÃO _____

ESTIMATIVA \approx NITRATOS no SOLO? _____ (sacas/ano/alq) adubo

_____ (sacas/ano/alq) salitre

Tipo Pastagem? _____ Altitude: ☐ (Baixa, Média, Alta)

Acesso à alimentação: ☐ (Pastagem Livre; Presas à Estaca; estabulação E)

Há práticas de Desbaste dos Fetos? ☐ (Sim, Não)

Há aplicação de herbicidas? ☐ (Sim, Não) Tipo de herbicida? _____

Grau Infestação *Pteridium sp*? ☐ (Ausente, Presente Barreiras, Presente Pasto, Presente Barreiras e Pasto)

Estimativa de infestação *Pteridium sp* até 10% ☐ 10 a 20% ☐ > de 20% ☐

Sinais de herbivoria de *Pteridium sp*? ☐ (- / + / ++ / +++)

DADOS relativos à DIETA COMPLEMENTAR

QUANTIDADE de CONCENTRADO para o GRUPO? _____ (sacas/dia)	
DÁ SUPLEMENTOS ao GRUPO?	<input type="checkbox"/> (Sim, Não)
caso afirmativo, qual a frequência de oferta? _____ / gueixa ou Vaca / ano (BLocos, BAlde, CIlindros, Utros)	
DÁ “BALAS” ao GRUPO?	<input type="checkbox"/> (Sim, Não)
caso afirmativo, qual a frequência de oferta? _____ “balas” / gueixa ou Vaca / ano	
A CONFORMAÇÃO CORPORAL DAS GUEIXAS É “HETERÓGENEA”?	<input type="checkbox"/> (Sim, Não)

DESVIOS do ESTADO de SAÚDE

Nº GUEIXAS com sinais de acromotriquia?	_____ dia da visita
Nº GUEIXAS com PAPILOMAS?	_____ dia da visita
Localização dos Papilomas? _____	
Nº CASOS de HEMATÚRIA?	_____ dia da visita
Nº INTOXICAÇÕES AGUDAS?	_____ / 2002
Nº MORTES (Hematúria/Intoxicação)?	_____ / 2002

VACAS em PRODUÇÃO
DADOS relativos às PASTAGENS

FOLHA 1:

FOLHA 2:

FOLHA 3:

DADOS relativos à DIETA COMPLEMENTAR

QUANTIDADE de CONCENTRADO para o GRUPO? _____ (sacas/dia)

DÁ SUPLEMENTOS ao GRUPO? ☐ (Sim, Não)

caso afirmativo, qual a frequência de oferta? _____ / gueixa ou Vaca / ano (BLocos, BAlde, Cilindros, Utros)

DÁ “BALAS” ao GRUPO? ☐ (Sim, Não)

caso afirmativo, qual a frequência de oferta _____ “balas” / gueixa ou Vaca / ano

A CONFORMAÇÃO CORPORAL DAS VACAS É “HETERÓGENEA”? ☐ (Sim, Não)

DESVIOS do ESTADO de SAÚDE

Nº Vacas com sinais de acromotriquia? _____ dia da visita

Nº vacas com PAPILOMAS? _____ dia da visita

Localização dos Papilomas? _____

Nº CASOS de HEMATÚRIA? _____ dia da visita

Nº INTOXICAÇÕES AGUDAS? _____ / 2002

Nº MORTES (Hematúria/Intoxicação)? _____ / 2002

ANEXO 2

Ptaquiloside extraction by Low Pressure Liquid Chromatography and preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The pure Ptaquiloside will be isolated and purified from bracken powder using procedure described by (Rasmussen et al. 2005a), with a few re-arrangements:

- 1) After dried and ruffely mild and store in box, the powder is finely milled;
- 2) 10g of fine powder are added to 6 polypropylene 200ml centrifuge flasks;
- 3) 100 ml of triple-deionized water (TD) (conductivity, < 0.5 $\mu\text{S cm}^{-1}$) is added to each flask;
- 4) The bracken is shaken in dark during 60 hours (horizontal, 120 shakes min.⁻¹) covered in aluminium foli;
- 5) The flasks are centrifuge during 20 min at 5°C, the crude extract is filtered transferred to a beaker;
- 6) Step 3, 4 and 5 are repeated a second time;
- 6) 75 ml of supernatant is passed through 3.0 g of Polyamide 6 (Fluka, Steinheim, Switzerland) (dry packed) in 10 columns of 1.0 x 10 cm I.D. glass Econo-Column® (BIO-RAD, New York, USA) fitted with a 18 μm polymer filter;
- 7) The eluate is dived in two portions and each one eluated through a 2.5 x 30 cm I.D. glass Econo-Column®, wetpacked, fitted with 18 μm polymer filter, and containing 100 ml of Amberlite XAD® 2 resin (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The columns are washed with TD, and all eluates are discarded;
- 8) The analyte is extracted with 50 + 150 ml of Methanol (Sgima-Aldrich®, HPLC grade) (MeOH) into a round-bottomed flask. The organic solvent is evaporated into dryness under reduce pressure in rotary-evaporated at 45°C;
- 9) The residue is dissolved in TD and added to a polyamide 6 column (1.00 g Polyamide, 1.0 x 10 cm I.D. glass Econo-Column®, drypacked), fitted with 18 μm polymer filter;
- 10) Then the eluates are added to Chem Elut 12198008 column (Varian, USA), and the column is flushed with 200 ml of Ethyl Acetate (Sgima-Aldrich®, HPLC grade), and once again evaporate under reduce pressure at 45°C in rotary-evaporated;
- 11) The residue is dissolved in 15 ml of Ethyl Acetate (Sgima-Aldrich®, HPLC grade) and transferred to 50 ml conical flasks, than the organic solvent is evaporated according to the procedure previously described;
- 12) This final residue, Crude PTA, have a purity around 60 to 80%, and is dissolved in 6,5 ml of Milli-Q® (Milli-Q Plus; Millipore, Copenhagen, Denmark) (18.2 M Ω cm);

13) Reverse-phase liquid chromatography separation, 1 ml of the solution is separated in isocratic gradient 40% MeOH and 60% Milli-Q water, in a 250 x 10 mm Phenomenex Luna® column (Luna 10µ-Prep C8(2) 100Å, with a column temperature of 40°C, and a flow of 5 ml min.⁻¹;

14) The eluate solution from the PTA's peak is rotary evaporated (as previous describe), the residue will be dissolved in 15ml Milli-Q, transferred to 30 ml amber flasks which is freeze and finally freeze dried.

Determination of PTA in bracken powder

The PTA's concentration bracken powder is determine by indirect measurement, according to method described by (Agnew & Lauren 1991). Eight samples of 0.50 g of fine milled bracken powder are shaken for one hour in 50 ml tubes with 25 ml TD (covered in aluminium foil), then centrifuged (7500rpm) during 15 minutes at 5°C. Moreover, the 4 ml of supernatant are clean in 0.50 g of Polyamide 6 resin (Fluka, Steinheim, Switzerland) (dry packed) on a 1.0 x 10 cm I.D. glass Econo-Column® (BIO-RAD, New York, USA) fitted with 18 µm polymer filter. One ml of the eluate of each column is collect into amber flasks, 75µL of NaOH (1M) is added and the flasks incubated for 60 min at 45°C. Afterwards, 75 µL of HCl (5M) is added to the flasks and PTB analysed in the LC-UV system, using the specific gradient elution for PTB analysis.

References

Agnew, M.P. & Lauren, D.R. 1991. Determination of Ptaquiloside in Bracken Fern (Pteridium-Esculentum). *Journal of Chromatography*, 538, (2) 462-468 available from: ISI:A1991EY98500028.

Rasmussen, L.H., Hansen, H.C.B., & Lauren, D. 2005a. Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (Pteridium sp.) constituent, in the soil environment. *Chemosphere*, 58, (6) 823-835 available from: ISI:000226935800014

ANEXO 3

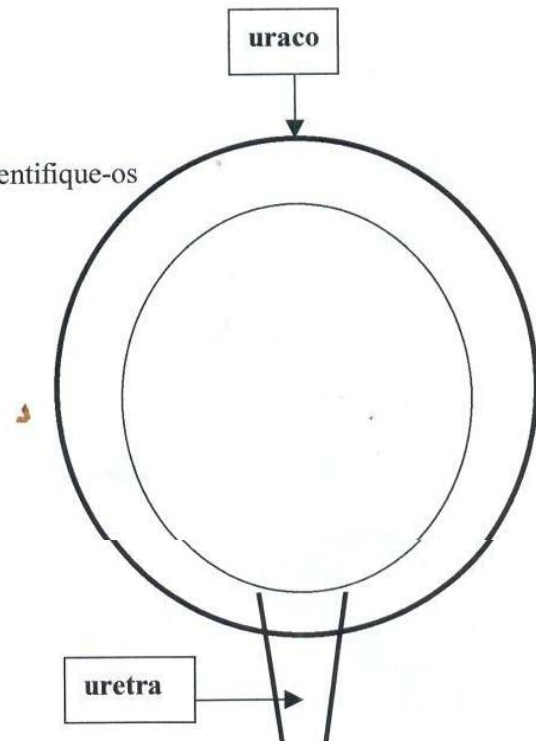
FORMULÁRIO DE COLHEITA

Nº do Bovino

Idade

Descrição do tipo de tumores identificados

Localize-os na bexiga desenhada em anexo e identifique-os com um número



Nº da neoplasia	> 1cm	1-2cm	2-5cm	5-7cm	7-10 cm	> 10 cm

Nº de fragmentos colhidos

Data

O Inspector Sanitário

ANEXO 4